

Landbouwhogeschool-Wageningen  
CENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK IN SURINAME

VERKENNENDE ONDERZOEKINGEN NAAR DE OVERERVING VAN  
ZAADHUIDKLEUR EN ZAADHUIDPATROON BIJ  
VIGNA UNGUICULATA (L.) WALP.  
(onderzoekproject no. 70/12)

J.K.L. Sakiman

Verslag van een onderzoek verricht onder leiding  
van Dr. Ir. G.A.M. van Marrewijk

januari 1971

## I N H O U D

	Blz.
1. <u>Samenvatting</u> . . . . .	5
2. <u>Voorwoord</u> . . . . .	5
3. <u>Algemene gegevens over Vigna unguiculata</u> . .	6
4. <u>Literatuuroverzicht betreffende de over- erving van de zaadhuidkleur en het zaad- huidpatroon</u> . . . . .	7
4.1. Inleiding . . . . .	7
4.2. Enkele theorieën over de overerving van de zaadhuidkleur en het zaadhuid- patroon . . . . .	7
5. <u>Onderzoek op het CELOS</u> . . . . .	9
5.1. Inleiding en probleemstelling . . . . .	9
5.2. Methodiek . . . . .	10
5.3. Resultaten van uitsplitsing . . . . .	10
5.4. Beschrijving van de verkregen zaad- huidtypen . . . . .	20
5.5. Overerving van zaadhuidkleur . . . . .	23
5.6. Overerving van zaadhuidpatronen . . . . .	31
6. <u>Literatuur</u> . . . . .	41

## 1. SAMENVATTING

Een verkennend onderzoek naar de overerving van zaadhuidkleur en zaadhuidpatronen bij *Vigna unguiculata* (L.) Walp. leverde de volgende resultaten op:

1. Zaadhuidkleur berust op de aanwezigheid van een grondfactor R en specifieke kleurgenen. De grondfactor R is dominant en veroorzaakt de grondkleur (paars)rood.
2. Zwarte zaadhuid wordt veroorzaakt door de dominante factor  $Z_1$  welke epistatisch is t.o.v. andere kleurgenen. Mogelijk bestaat een tweede (recessieve) factor voor "zwart". Deze komt alleen tot uiting bij afwezigheid van  $Z_1$  en is eveneens epistatisch t.o.v. andere kleurfactoren.
3. Bruine kleur van de zaadhuid berust op een dominante factor B.
4. De twee bekende bij het onderzoek betrokken ouders hebben vermoedelijk de volgende genetische constitutie:  
Blackeye =  $Z_1Z_1BBRR(z_2z_2)$   
African Red =  $z_1z_1bbRR(Z_2Z_2)$
5. Effen zaadhuidkleur berust waarschijnlijk op de complementaire werking van twee dominante genen, H en W. De factor H alleen veroorzaakt in homozygote vorm het zaadhuidpatroon "Holstein" of bont, terwijl W verantwoordelijk is voor het ontstaan van een onduidelijk begrensde navelvlek en vaak vuile zaadhuidkleur, in de literatuur aangeduid als "Watson".
6. In afwezigheid van H en W ontstaat "klein oog", een zaadtype met duidelijk begrensde kleine navelvlek. De heterozygoot Hhww heeft een eveneens duidelijk begrensde middelgrote tot grote navelvlek ("groot of middelgroot oog") en vaak kleurstippels op de zaadhuid.
7. In een groep  $F_2$ -lijnen werden afwijkingen van het, op grond van de onder punten 5 en 6 beschrevene, te verkrijgen overervingsschema gevonden. In de  $F_3$  werd slechts in een incidenteel geval een niet met de hypothese kloppend resultaat verkregen.
8. Op het H-niveau werkt waarschijnlijk een extra-gen, dat graduele verschillen bij bont, groot oog, middel oog en klein oog veroorzaakt. De gegevens wijzen erop dat ook binnen het Watson patroon een of meer intensiteitsgenen werkzaam zijn. Verder onderzoek is noodzakelijk.

## 2. VOORWOORD

Dit verslag heeft betrekking op een onderzoek naar de zaadhuidkleurovererving bij *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Een deel van het onderzoek werd verricht op het Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek in Suriname in de periode mei tot december 1970 door J. Sakiman, studente in de Plantenveredeling aan de Landbouwhogeschool te Wageningen, met medewerking van werkkrachten van het CELOS. De eerste fasen van het onderzoek werden uitgevoerd in 1969 door achtereenvolgens Mej. M.F. Vis en Mevr. S.B. Hofstede-van der Meer van wier gegevens in dit verslag met dank gebruik werd gemaakt.

De leiding van het onderzoek berust bij Dr. Ir. G.A.M. van Marrewijk.

### 3. ALGEMENE GEGEVENS OVER VIGNA UNGUICULATA

*Vigna unguiculata* (L.) Walp. behoort tot de familie Papilionaceae, orde Leguminosae. Er is vrij veel verwarring over de naam van deze plant en er bestaan verschillende synoniemen. Sommige taxonomen onderscheiden de soorten *V. sinensis*, *V. sesquipedalis* en *V. unguiculata* - waarvan *unguiculata* de primitieve en *sinensis* de meer gecultiveerde droogboonvormen zouden omsluiten, terwijl de species *sesquipedalis* dan de langpeulige vormen (kouseband) bevat - maar ze kruisen gemakkelijk onder elkaar. Gebruikt wordt hier de naam *Vigna unguiculata* om de gecultiveerde "cowpea" aan te duiden en *Vigna sinensis* (L.) Savi ex Hassk. kan als synoniem beschouwd worden (WIENK, 1963).

*Vigna* (cowpea) wordt reeds lang gecultiveerd in Afrika en Azië. Het wilde type is vrij sterk verbreid in tropisch Afrika, zodat aangenomen kan worden dat de cultuurvormen hiervan afkomstig zijn. Later verbreidde het gewas zich over het Middellandse zeegebied. In de 16<sup>e</sup> eeuw werd de cowpea door de Spanjaarden geïntroduceerd in Amerika. Zij komt nu algemeen voor in de tropen en subtropen.

In tropisch Afrika is de cowpea het tweede belangrijkste peulvruchtgewas na *Phaseolus vulgaris*. De gedroogde zaden kunnen fijngemalen worden tot meel, dat op verschillende manieren gebruikt kan worden. De verse zaden en onvolwassen peulen worden gegeten en kunnen bevroren of ingeblikt worden zoals soms in Amerika wordt gedaan. Ook de jonge scheuten en bladeren worden gegeten en zijn één van de meest gebruikte groenten in tropisch Afrika. De cowpea geeft na snoeien in een vroege fase, weer nieuwe bladeren. Hierdoor kan het gewas ook gebruikt worden als veevoeder in de vorm van hooi. Ook als groenbemester vindt het gewas toepassing. In Suriname worden de gedroogde zaden vermengd met rijst en vlees gegeten (moksi ales).

Cowpeas kunnen goed groeien op een grote verscheidenheid van gronden, als ze maar goed gedraineerd zijn. Ze kunnen ook goed tegen hitte en relatief droge omstandigheden. In Suriname wordt cowpea (pesi) geteeld op zandgronden of na de rijstogst op sawahs. In het laatste geval worden ze voor of vlak na de rijstogst gezaaid, zodat de planten in de eerste groeifase nog wat vocht hebben. De teelt in het Surinaamse klimaat is tamelijk riskant door de wisselvalligheid van het weer. Het risico wordt sterk verminderd door ze op ruggen te planten. In de Wageningenpolder zijn er veelbelovende resultaten verkregen met gemechaniseerde teelt op ruggen (OSTENDORF, 1962; p. 91).

Cowpea kan beschouwd worden als een korte-dag plant. De plant is een klimmend of halfklimmend, kruidachtig gewas. De bloemen openen vroeg in de morgen, sluiten zich vóór 12.00 uur en vallen dezelfde of de volgende dag af. Twee of meer peulen worden gedragen op één bloeistengel. Het aantal zaden in de peulen kan variëren van 5 - 25. De zaden verschillen in grootte, vorm en kleur. De plant kan geogst worden binnen 2 - 3 maanden na inzaai. Een nadeel is, dat de peulen meestal niet gelijktijdig afrijpen.

#### 4. LITERATUUROVERZICHT BETREFFENDE DE OVERERVING VAN DE ZAADHUIDKLEUR EN HET ZAADHUIDPATROON

##### 4.1. INLEIDING

Over de overerving van de morfologische kenmerken van Vigna is vrij veel geschreven daar het gewas zich goed leent voor onderzoek. Het is een zelfbevruchter die vrij gemakkelijk kunstmatig te bestuiven is. Het kan gemakkelijk geteeld worden en neemt weinig ruimte in beslag. De totale groeiduur is ruim 2 maanden, zodat als het nodig is per jaar gemakkelijk 3 of meer generaties kunnen worden bestudeerd.

##### 4.2. ENKELE THEORIEËN OVER DE OVERERVING VAN ZAADHUIDKLEUR EN ZAADHUIDPATROON

SPILLMAN (1911, in HARLAND, 1919) was één van de eerste onderzoekers die de overerving van bepaalde karakteristieken en in het bijzonder van de "oog" patronen naging. Op grond van de uitsplitsingen na kruising van "small eye" (klein oog) en "solid colour" (effen) concludeerde hij dat deze 2 typen in 2 factoren verschillen die onafhankelijk van elkaar overerven. Hij stelde de volgende genotypen voor: 1. effen = WWHH; 2. Watson = WW $h$ h; 3. Holstein = wwHH en 4. klein oog = ww $h$ h.

HARLAND (1919, 1920, 1922) vond in geen enkel geval zulke simpele resultaten als SPILLMAN, maar de door hem verkregen gegevens gaven een indirecte bevestiging van Spillman's hypothese. Hij vond verder dat Spillman's conclusies niet algemeen geldig waren. Na uitgebreid onderzoek kwam hij tot een acceptabele factoriële analyse. Zo vond hij in 2 kruisingen tussen "Red Solid" (effen rood) en "Small eye" (klein oog) dat daar 3 onafhankelijk overervende factoren een rol speelden; nl.:

W = factor voor het Watson patroon

H<sub>1</sub> en H<sub>2</sub> = factoren voor het Holstein patroon.

Een combinatie van W en één van de Holstein factoren produceert het effen type, terwijl de afwezigheid van alle 3 factoren het klein oog patroon geeft. Volgens hem zou Spillman de effen vorm  $WWH_1H_1h_2h_2$  of  $WWh_1h_1H_2H_2$  hebben gebruikt. Zwarte zaad huidkleur wordt volgens hem veroorzaakt door de factor B die "dominant" is t.o.v. niet-zwart; N is een factor die een geelbruine (buff) kleur produceert, terwijl M een roodbruine (maroon) kleur veroorzaakt. Al deze genen zouden slechts werken in aanwezigheid van een grondfactor voor kleur R. Het door hem voorgestelde schema van genotypen (met weglating van heterozygoten) luidt dan:

Zwart	= RB ....
Bruin	= RbNM
Bruingeel	= RbNm
Bruinrood	= RbnM
Wit	= r .....

MANN (1914; in SAUNDERS, 1959) bestudeerde de kleurvorming in de zaad huid en vond 2 pigmenttypen: een melanineachtige stof en een anthocyanine die zuur- of basisch-reagerend kan zijn. Beide pigmenten kunnen gelijktijdig aanwezig zijn, gewoonlijk in verschillende cellen, maar soms ook in dezelfde cel. Witte zaad huid kleur duidt op afwezigheid van het basale melanine-achtige pigment. Bij alle kleuringen van de palissadecellen van de zaad huid zijn de kleuren gesuperponeerd op de melanine onderlaag.

In 1929 werden, op een enkele uitzondering na, Harland's bevindingen over de zaad huid kleur bevestigd door SPILLMAN en SANDO na een uitgebreid onderzoek. Zij voerden een factor G in voor de verandering van Holstein vlekken in kleine vlekjes (zie SAUNDERS, 1959). CAPINPIN (1935; in SAUNDERS, 1959) nam een verband waar tussen bloem- en zaad huid kleur en dacht dat dit veroorzaakt werd door een sterke koppeling.

SMITH (1956) bestudeerde de overerving van zwarte en bruingele zaad huid kleur en de zaad huid patronen effen, Watson, bont en klein oog. Hij vond geen bewijs voor koppeling tussen de kleur- en patroongeneten en hij stelde W voor Watson, H voor bont, en WH voor effen verantwoordelijk.

SAUNDERS (1959) bevestigde de constitutie van genotype volgens Harland en gaf te kennen dat paars zaad dominant was of epistatisch t.o.v. alle andere kleuren en zwart t.o.v. de andere behalve paars.

Zwart kan van elke genische compositie zijn zolang het gen voor zwart, B, en het basiskleurgen, waarschijnlijk R (= het gen voor rode zaad huid), aanwezig zijn. De resultaten van zijn onderzoekingen maakten het waarschijnlijk dat de genetische basis voor de effen kleuren van de zaad huid aldus is:

paars	= RP ....
zwart	= RpB ....
bruin	= RpbNM
bruingeel	= RpbNm
roodbruin	= RpbnM
rood	= Rpbnm
wit	= r ....

Er werden geen aanwijzingen gevonden dat er koppeling bestaat tussen de verschillende kleurgeneten bij de effen typen.

Het pigment in "bruin gevlekt" leek te verschillen van dat in de effen kleuren. Deze vlekking kan gesuperponeerd zijn op een bruingele of bruinrode zaad huid. Het gen voor vlekken V, dacht hij gekoppeld met N te zijn. Fijne stipfels, die een grijsig voorkomen geven en grotere spikkels komen alleen in zwart voor. Zij kunnen allebei gesuperponeerd zijn over gevlekt, bruin, bruingeel, roodbruin en rood effen kleuren. De kleurtekening van het ras Victor is toe te schrijven aan de aanwezigheid van zowel gevlekt als grijs in de zaad huid. Spikkels zijn erg variabel van vorm en grootte, niet alleen tussen zaden van verschillende peulen van verschillende planten, maar ook bij zaden uit een peul of zelfs op één zaad (SAUNDERS, 1959).

Volgens SAUNDERS (1959), zijn de zaadhuidpatronen Watson, Holstein (bont), oog en hilum-ring het resultaat van complementaire werking van 3 hoofdgenen welke ook de bloemkleur bepalen. Zaadhuidpatronen en bloemkleur resulteren volgens deze auteur uit de multipele effecten van bepaalde genen. Volgens hem hebben planten met effen of met Watson zaadpatronen donkerviolette bloemen, die met bonte of oog-zaadpatronen licht violette bloemen, die met hilum-ring zaden heel licht paars getinte bloemen en die met witte zaden ook witte bloemen.

Hij suggereerde het volgende schema:

Effen	=	WHO
Watson	=	WhO
Bont	=	wHO
Klein oog	=	whO
Hilum-ring	=	W <sup>h</sup> O, W <sup>o</sup> , w <sup>H</sup> O en w <sup>h</sup> o.

## 5. ONDERZOEK OP HET CELOS

### 5.1. INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

Uit de kunstmatige bestuivingen tussen African Red (effen rood) en Blackeye (zwart klein oog) uitgevoerd door Mej. M.F. Vis in 1969 werden effen zwarte zaden verkregen. Daarnaast werden ook "spontaan" ontstane zwarte zaden gevonden bij Blackeye ouderplanten in een onderzoek naar natuurlijke bastaarding bij *Vigna unguiculata* (project 69/7, zie CELOS Kwartaalverslagen 9 t/m 12).

Deze zwarte F<sub>1</sub>-zaden werden uitgezaaid door Mevr. S.B. Hofstede-van der Meer en gaven in de F<sub>2</sub> een brede uitsplitsing voor verschillende eigenschappen, zoals bloemkleur, bloemgrootte, bloemsteellengte, zaadhuidkleur enz. Er werden naast de oudertypen en het F<sub>1</sub>-type ook andere zaadhuidkleuren en -patronen gevonden. Hieruit werd afgeleid dat zaadhuidkleur niet monofactorieel overerft. De lijnen verkregen van zwarte zaden uit het Blackeye oudermateriaal splitsten ook in diverse zaadhuidkleuren en zaadhuidpatronen uit. Wel leek het onwaarschijnlijk dat deze zwarte zaden uit kruisingen van Blackeye met African Red voortgekomen waren, wegens het volledig ontbreken van de zaadhuidkleur rood.

Aan de hand van de uitsplitsingen in de F<sub>2</sub> en de F<sub>3</sub> en door vergelijking met de literatuurgegevens wordt getracht de zaadhuidkleurovererving te analyseren en het aantal in het betrokken materiaal werkzame kleur- en patroonfactoren te bepalen.

## 5.2. METHODIEK

De indeling naar oogomvang en zaadhuidtekening werd in eerste instantie gebaseerd op die van Spillman (in: HARLAND, 1919). Maar er werden enige graduele verschillen gevonden in de zaadhuidtekening in het eigen materiaal, die niet door Spillman worden genoemd. Daarvoor werd een verdere onderverdeling gemaakt binnen enkele van de hoofdtypen (zie foto's en beschrijving zaadhuidtypen sub 5.4).

De twee onder 5.1 beschreven typen zwarte zaden ( $F_1$ ) werden op 1 augustus 1969 uitgezaaid op vlakke bedden in verband 30 x 30 cm. Van het type "spontaan" zwart zaad waren 17  $F_2$  lijnen aanwezig, van het door legitieme kruising verkregen type 14. Vooral de laatste lijnen waren van geringe omvang, omdat de in de kas in potten geteelde  $F_1$ 's in het algemeen weinig zaden hadden geproduceerd.

In de generatieve fase werd van alle bloemen naast de datum van bloeibegin, de bloemkleur en de bloemsteel-lengte (welke in dit verslag niet aan de orde komen), een aantal zaadhuidkenmerken geregistreerd: kleur van de zaadhuid, oogkleur, oogomvang, zaadhuidtekening en zaadgrootte en -vorm.

Uit het verkregen  $F_2$  materiaal werd een selectie gemaakt, waarin alle voorkomende zaadhuidtypen waren vertegenwoordigd. De selectielijnen werden nauwkeurig beschreven en begin augustus 1970 uitgezaaid. Omvangrijke lijnen kwamen op het veld in verband 30 x 30 cm met om de drie bedden een 1 meter breed tussenpad om het waarnemen en oogsten te vergemakkelijken. Kleine lijnen werden in potten gezaaid en op tafels in de kas geplaatst.

Aan de bloeiende planten werd weer de datum van eerste bloei en de bloemkleur bepaald. Hiertoe werd aan een stengel van elke plant een koordje bevestigd waarvan de kleur met een bepaalde bloemkleurtype correspondeerde. Na rijping werden de planten individueel geoogst en de peulen met het kleur-koordje in een zak geborgen. Op de zakken werd het nummer van de  $F_3$ -lijn, het plantnummer, de inzaaidatum en de oogstdatum genoteerd. De peulen werden één voor één gedopt en incidentele peulen met anderskleurige zaden werden verwijderd. Vervolgens werden de zaadhuidkleur en zaadhuidtekening bepaald en op voorgestencilde waarnemingslijsten ingevuld. Zaadgrootte en -vorm werden wegens tijdsgebrek niet geregistreerd.

## 5.3. RESULTATEN VAN UITSPLITSING

Precies 6 weken na zaai van de  $F_3$ -lijnen werd de eerste bloei waargenomen en kon met de bloemkleurbepalingen begonnen worden. Er werd getracht een onderscheid te maken tussen lichte en donkere bloemkleur en wit met een zeer licht paarse tint. Volledig witte bloemen werden niet gevonden, wel bloemen met een volledig witte vlag en lichtgetinte zwaarden. Later bleek echter dat ook op de vlag wat kleur aanwezig was als streepjes of als vlekjes. Ook in het "licht" en "donker" werden er schakeringen van violet gevonden, zoals roodachtig of blauwachtig. De bepaling was hierdoor vrij moeilijk temeer omdat de bloem-



kleur van een plant zich in de loop van de bloeitijd soms wijzigde. Er werd daarom besloten om een analyse van de bloemkleur hier achterwege te laten en voor een later stadium te bewaren. De laatste kleurbepaling werd op 29 oktober gedaan.

Met de oogst werd begonnen op 15 oktober en de laatste planten werden op 14 november binnengehaald.

In tabel 1 zijn de aantallen uitgezaaide F<sub>3</sub>-lijnen van verschillende typen weergegeven.

De resultaten van de F<sub>2</sub> en F<sub>3</sub> waarnemingen zijn samengevat in de tabellen 2 t/m 4. Hierin zijn de lijnen voorafgegaan door I t/m IV afkomstig van "spontane zaden", die voorafgegaan door V t/m VIII van kruisingen tussen African Red en Blackeye.

Tabel 1. Overzicht van de aantallen uitgezaaide F<sub>3</sub>-lijnen

zaadhuidtype	aantal uitgezaaide F <sub>3</sub> -lijnen	
	uit zwart kruisingszaad	uit "spontaan" zwart zaad
Effen zwart	5	4
Zwart bont	7	6
Zwart groot oog	3	3
Zwart middel oog	2	3
Zwart klein oog	3	4
Doorgelopen zwart oog (Watson)	8	8
Effen bruin	4	4
Bruin bont	3	4
Bruin groot oog	2	-
Bruin middel oog	3	3
Bruin klein oog	1	1
Doorgelopen bruin oog (Watson)	5	5
Effen rood	4	-
Rood groot oog	1	-
Doorgelopen rood oog (Watson)	2	-

Tabel 2. Uitsplitsing van een aantal F<sub>2</sub>-lijnen uit "spontane" zwarte zaden (I t/m IV) resp. uit kruisingen tussen African Red en Blackeye (V t/m VIII).  
 Z = Zwart; B = Bruin; R = Rood

F <sub>1</sub>	EFFEN		BONT		GROOT OOG		MIDDEL OOG		KLEIN OOG		WATSON		Zaadhuïd-kleuren		Zaadhuïd patroon						T O T A A L			
	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R	E F F E N	B O N T	G R. O O G	M I D D. O O G	K L. O O G		W A T S O N		
																							Z	B
I-31	14	7		1									20	8		21	1	1			4	1	5	28
I-34	9	2											13	6		11	2				4	1	5	19
I-36	2	10		3									26	11		22	4				4	10	5	19
II-4	12	5		4									28	7		20	2				2	5	3	37
II-5	15	4		2			1						27	6		19	1				1	2	3	33
II-7	15	4		2			1						27	6		19	1				2	5	3	33
II-8	15	4		2			1						27	6		19	1				2	5	3	33
III-14	11	12		1									19	2		12	2				1	2	1	21
III-20	9	1		1									13	5		11	2				1	2	1	18
III-26	1	3		2									7	6		4	1				2	1	2	7
III-30	1	1		2									6	2		1	1				2	1	2	8
III-36	11	3		2									31	10		13	3				3	1	2	37
III-40	10	3		2									23	10		13	3				3	1	2	33
IV-3	2	1		3									4	1		2	1				1	3	5	19
IV-13	11	1		1									18	2		12	5				1	3	7	19
IV-19	4	2		8									7	6		5	25				1	7	9	19
IV-21	23	1		1									45	2		25	5				5	7	5	51
V-6	4	2		2									12	4		6	3				3	3	3	16
V-12	5	1		2									11	1		8	1				1	2	2	14
V-13	6	1		1									11	1		8	1				1	2	3	13
V-15	4	1		1									7	3		4	1				1	3	3	10
V-26	8	1		1									13	1		9	1				1	3	4	14
V-27	6	1		1									14	1		7	1				1	3	4	17
V-30	4	1		1									8	2		5	2				1	1	1	10
V-38	2	1		1									7	1		2	2				2	1	1	7









(vervolg tabel 4)

F <sub>2</sub>	EFFEN		BONT		GROOT OOG			MID. OOG			KLEIN OOG			WATSON			TOTAAL			G. R. OOG	M. I. D. OOG	K. L. OOG	W. A. T. S. O. N.	T. O. T. A. A. L.			
	Z	R	Z	R	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R	Z	B	R								
Gr.oog zwart:																											
V-12- 2	2		15																								
V-27-11	1		4																								
V-30- 2			5																								
VIII-20- 9			6																								
VIII-26- 3																											
Gr.oog bruin:																											
V-15-10																											
V-30- 6																											
Gr.oog rood:																											
VIII- 5-11																											
Mid.oog zwart:																											
V-27- 9	2		5																								
VIII-21- 1	1		2																								
Mid.oog bruin:																											
V-27- 1																											
VIII- 7- 3	2																										
Kl.oog zwart:																											
V-26- 1	1																										
V-27- 8																											
VIII-21- 5																											
Kl.oog bruin:																											
VIII- 5- 3																											
Watson zwart:																											
V-12- 4																											
V-13- 4																											
V-15- 6																											
V-26- 5																											
V-26- 9																											





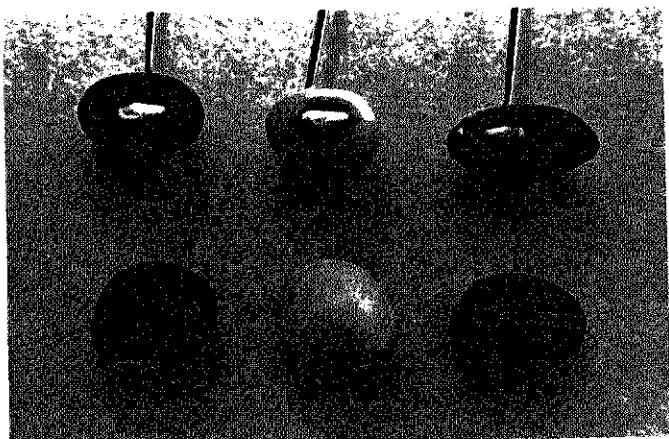


Foto 1. Zaadhuidkleuren bij *Vigna unguiculata*: zwart, bruin en rood.

Foto 2. Bonte zaadhuidpatronen: zwart oppervlak  $< 50\%$ , ongeveer  $50\%$ ,  $> 50\%$ .

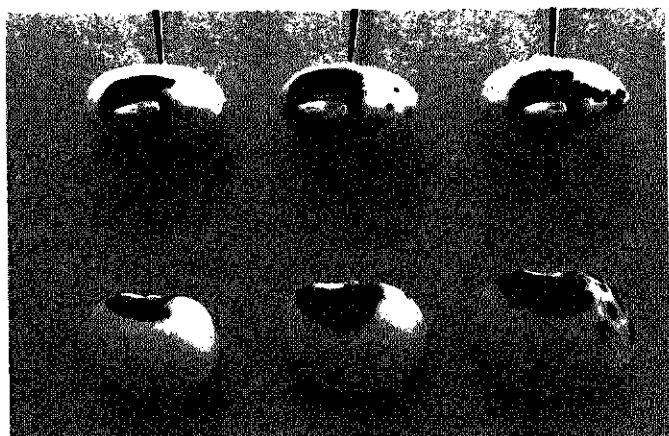
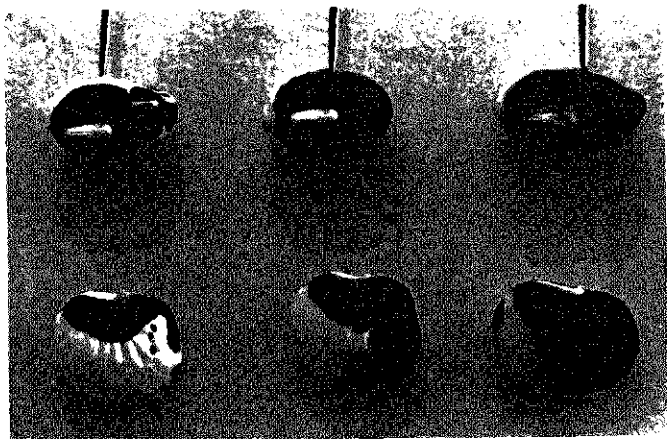


Foto 3. Zwarte oogpatronen: klein oog, middelgroot oog, groot oog.

#### 5.4. BESCHRIJVING VAN DE VERKREGEN ZAADHUIDTYPEN

##### 1. Effen zwart (zie foto 1)

In dit type komt er behalve voor vorm en grootte van het zaad eigenlijk geen variatie voor. Alle zaden zijn intens zwart gekleurd. Soms worden "gemarmerde" zaden aangetroffen, waar het zwart pleksgewijs verdwenen is, vermoedelijk door mechanische beschadiging (oppervlakkige aantasting door parasieten).

##### 2. Effen bruin (zie foto 1)

Er werd enige variabiliteit van kleur gevonden binnen en tussen lijnen. Onderscheiden werden o.a. flets beige bruin (III-36-17), bruin (I-31-19, III-36-34), flets roodbruin (VIII-12-13), vele tinten van paarsbruin via bruin naar grijsig bruin (VI-11-9).

##### 3. Effen rood (zie foto 1)

Kleurvariatie werd nauwelijks gevonden.

##### 4. Zwart bont (zie foto 2)

Dit type vertoont grote variatie en er zijn geen duidelijke grenzen aan te geven. Naar toenemend egaal zwart oppervlak werden de volgende typen onderscheiden:

- zwart oppervlak  $< 50\%$
- zwart oppervlak  $\pm 50\%$
- zwart oppervlak  $> 50\%$

Echter werden ook grote verschillen in vorm, aantal en grootte van de kleurvlekken op het witte deel van de zaadhuid gevonden.

##### 5. Bruin bont

Dezelfde variatie als bij zwart bont werd hier aangetroffen. Opgemerkt moet worden dat ook binnen een lijn of plant verschillen voorkwamen.

##### 6. Rood bont

Hier geldt het onder 4 en 5 gezegde.

##### 7. Zwart groot oog (zie foto 3)

Dit type vertoont een grote zwarte vlek rond de navel welke aan de onderzijde onregelmatig begrensd is. Vele zaden vertonen daarnaast speldeknoopvormige vlekjes op de zaadhuid. Vrij grote variatie in aantal, grootte en vorm van de spikkels werd waargenomen.

##### 8. Bruin groot oog

Deze bruine pendant van 7 heeft i.h.a. een wat kleiner oog dan deze, terwijl ook de spikkeling meestal minder uitgesproken is.

##### 9. Rood groot oog

Oog en spikkeling komen volledig met die van zwart groot oog overeen.



Foto 4. Zwart Watson zaadhuidpatroon.

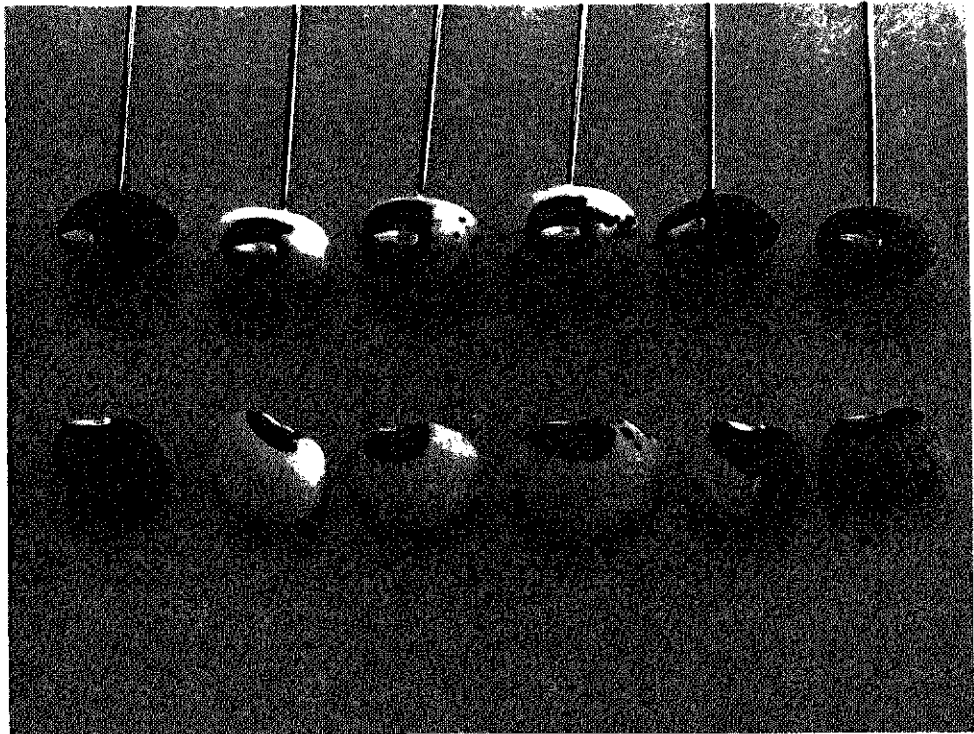


Foto 5. Overzicht van de zwarte zaadhuidpatronen bij *Vigna unguiculata*: effen, klein oog, middelgroot oog, groot oog, bont en Watson.

10. Zwart middelgroot oog (zie foto 3)

Vrij groot oog met ietwat onregelmatige begrenzing aan de hilumonderzijde. Soms enkele meestal kleine spikkels. De grenzen met groot oog zijn niet altijd duidelijk. In de verwerking werden deze typen dan ook tezamen genomen.

11. Bruin middelgroot oog

Matig groot oog met hooguit enkele kleine spikkels. Vaak moeilijk te onderscheiden van 8.

12. Rood middelgroot oog

Als 10.

13. Zwart klein oog (zie foto 3)

Klein oog met regelmatige begrenzingen. Zaadhuid overigens wit, zelden met een enkel zwart stipje en dan steeds vlak onder het hilum.

14. Bruin klein oog

Komt overeen met de desbetreffende categorie bij de zwartogige typen. Het oog is ook hier weer wat kleiner dan bij 13.

15. Rood klein oog

Geheel als 13.

16. Zwart Watson (zie foto 4)

Dit type is uitermate variabel. Het kleuringspatroon loopt van een vaag onbegrensd oog op bijna witte zaadhuid tot nagenoeg volgrijze zaden met witte vlekjes of stipjes. De volgende typen werden o.a. onderscheiden:

- zeer licht grijs: zaden vuilwit, met vaag begrensd zwart oog en enkele grijs-zwarte vlekjes/stipjes.
- licht grijs : als vorige doch gehele zaadhuid grijzig wit.
- grijs : als vorige doch zaadhuid overwegend grijs. Binnen deze groep werden nog weer lichte schakeringsverschillen gevonden, o.a. door de onderkleur van de zaadhuid. Er konden zwart-grijze, paarsgrijze en blauwgrijze zaden onderscheiden worden.
- donker grijs : grijsintensiteit verder toegenomen. Weinig aaneengesloten witte vlekken meer (zie foto 4).
- zeer donker grijs: zaadhuid bijna zwart, vooral rond het oog. Grondkleur nog zichtbaar als kleine witte vlekjes en stipjes.

17. Bruin Watson

Geen opvallende variatie in zaadhuidkleur. Dit type komt het meest overeen met Watson zwart zeer licht grijs. Het oog is groot, vaag begrensd, uitlopend onder het hilum in een zone met vlekjes en streepjes. Het stippeltjespatroon is erg licht.

18. Rood Watson

Ook hier eigenlijk maar één type, vergelijkbaar met Watson zwart zeer licht grijs. Groot oog die onder het hilum overgaat in een stippeltjeszone. Resterende zaadhuid wit met uiterst vage rode doorloop rond het oog. Een enkele keer wat sterker gekleurde typen gevonden.

5.5. OVERERFING VAN ZAADHUIDKLEUR

Er werden 3 kleuren gevonden: zwart, bruin en rood. De kleuren maroon (roodbruin) en buff (bruingeel), welke door o.a. HARLAND (1919) en SAUNDERS (1960) genoemd zijn, kwamen in het materiaal niet voor. Ook de kleur paars werd hier niet gevonden.

Zwart:

In de  $F_3$  werden de volgende uitsplitsingen van zwart gevonden:

1. splitst niet meer uit (homozygoot, zie tabel 5a),
2. splitst uit in: a. zwart en bruin (3 : 1, zie tabel 5b),  
b. zwart, bruin en rood (12 : 3 : 1, zie tabel 5c),  
c. zwart en rood (3 : 1, zie tabel 5d).

Bruin:

Bruinzadige  $F_3$ 's gaven de volgende uitsplitsingen te zien:

1. geen uitsplitsing (tabel 6a). Wel werden in vele  $F_3$ 's enkele zwarte zaden gevonden, doch deze zijn waarschijnlijk aan verbastering toe te schrijven,
2. splitsing in bruin en rood (3 : 1, tabel 6b).

Rood:

Splitst in de  $F_3$  niet uit. De enkele gevonden zwarte en bruine zaden zullen, gezien de kleine aantallen, wel veroorzaakt zijn door verbastering (tabel 7).

Gebaseerd op deze resultaten kan de volgende hypothese opgesteld worden:

Zwart = Z. ; epistatisch t.o.v. andere kleuren.

Bruin = B. ; hypostatisch t.o.v. zwart, epistatisch t.o.v. andere kleuren.

Rood = R. ; hypostatisch t.o.v. zwart en bruin.

R is tevens de grondfactor voor zaadhuidkleur. Volgens SAUNDERS (1960) zouden zaden die dit basiskleurgen niet bezitten wit zijn. Hier werden geen witte zaden gevonden, ook rood splitste geen witte zaden af. Dit wijst erop dat R in de ouderplanten in homozygote vorm aanwezig was. Bij

Tabel 5a. Overzicht van de voor zaadkleur niet uitsplitsende F<sub>3</sub>-lijnen uit zwartzadige F<sub>2</sub>'s

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen		Voorgesteld genotype
	Zwart	Andere	
lijnen I t/m IV:			ZZBBRR
III-14- 2	54	-	
III-36-28	11	-	
II- 4- 3	35	-	
III-36-14	41	-	
III-40- 7	22	-	
Totaal	163		
lijnen V t/m VIII:			ZZBBRR
V-13- 2	8	-	
V-26- 4	49	-	
V-12-10	37	-	
VIII-20- 4	46	-	
V-12- 4	27	-	
V-15- 6	44	-	
VIII- 5- 8	48	-	
V-38- 2	42	-	
V-12- 8	11	-	
V-27- 8	17	-	
VIII-21- 1	13	-	
V-12- 2	38	-	
V-27-11	24	-	
Totaal	404		

Tabel 5b. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit zwartzadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in zwart en bruin

F <sub>2</sub> -lijnen V t/m VIII	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen				Voorgestelde genotype F <sub>2</sub>
	Zwart	Bruin	Andere	Totaal	
VIII-17- 3	38	19	-	57	ZzBBRR
V-13- 4	17	4	-	21	
VIII-20-10	13	1	-	14	
V-26- 1	50	10	-	60	
VIII-21- 5	15	1	-	16	
Gevonden:	133	35	-	168	
Verwacht:	126	42			

$$x^2 = 1,167 \quad - 0,20 < P < 0,30$$

$$x^2_{0.05} = 3,81 \quad (df = 1)$$

Tabel 5b. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit zwartzadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in zwart en bruin.

F <sub>2</sub>	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen				Voorgesteld genotyp F <sub>2</sub> :
	Zwart	Bruin	Andere	Totaal	
lijnen I t/m IV					ZzBBRR
II- 8- 7	43	15	-		
III-36- 6	41	18	-		
III-36-19	47	10	-		
III-14- 3	53	12	-		
III-30- 5	47	14	-		
III-40-21	21	7			
III-40-28	2	1			
II- 4- 1	45	15			
II- 8-32	16	12			
III-36- 9	32	5			
II- 8-10	46	15			
III-36- 4	42	17			
III-36-20	46	15			
I-31-14	38	9			
II- 4-30	34	11			
II- 8-16	30	7			
III-36-30	31	12			
II- 7- 1	42	15			
II- 7- 2	26	9			
III-36- 1	33	15			
III-36-11	44	11			
III-40- 4	37	11			
III-40-11	24	8			
Gevonden	820	264		1084	
Verwacht	813	261			

$$\chi^2 = 0,241; \chi^2_{0.05} = 3,81 \text{ (df = 1)}$$

$$0,50 < P < 0,70$$

Tabel 5c. Overzicht van de voor zaadkleur niet uitsplitsende F<sub>3</sub>-lijnen uit zwartzadige F<sub>2</sub>'s.

F <sub>2</sub> -lijnen:	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen				Voorgesteld F <sub>2</sub> genotype
	Zwart	Bruin	Rood	Totaal	
V-12-10	33	11	2	46	Z.B.RR
V-27- 3	44	14	5	63	
V-26- 5	48	8	3	59	
V-26- 9	48	9	6	63	
V-27- 4	9	3	1	13	
VIII-14- 7	35	5	2	42	
VIII-20-11	27	10	1	38	
V-27- 9	33	12	3	48	
Verkregen	277	72	23	372	x <sup>2</sup> = 0,090
Verwacht	279	69,75	23,25		0,98 < P < 0,95

$$x^2_{0,05} = 5,99 \text{ (df = 2)}$$

Tabel 5d. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit zwartzadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in zwart en rood.

F <sub>2</sub> -lijnen:	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen				Voorgesteld genotype F <sub>2</sub> :
	Zwart	Rood	Andere	Totaal	
VIII-21-10	25	7	2		ZzbbRR
VIII-26- 3	34	9	1		
V-30- 2	9	1	-		
VIII-20- 9	26	11	-		
Gevonden	94	28	3		
Verwacht	91,5	30,5		122	

$$x^2 = 0,273; 0,50 < P < 0,70$$

$$x^2_{0,05} = 3,84 \text{ (df = 1)}$$



Tabel 6a. Overzicht van de voor zaadkleur niet uitsplitsende F<sub>3</sub>-lijnen uit bruinzadige F<sub>2</sub>'s

F <sub>2</sub> -lijnen I t/m IV	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Bruin	Andere (zwart)	Totaal	
I-31-19	42	-		zzBBRR
III-36- 7	34	6		
III-36-34	60	2		
III-40-26	21	-		
I-34-16	63	-		
IV-21-13	23	1		
IV-21-37	6	-		
II- 7-19	5	-		
III-14- 7	21	-		
III-36-15	50	5		
II- 8- 4	51	3		
II- 8-18	27	4		
III-20- 5	20	-		
III-36-10	21	7		
III-40- 1	22	1		
Verkregen	466	29	495	

F <sub>2</sub> -lijnen V t/m VIII	Bruin	Andere (zwart)	Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
VIII-21- 8	25	1		zzBBRR
VI-11- 9	12	2		
VIII-12-13	33	-		
VIII- 5- 7	32	-		
V-15- 7	1	1		
VIII-21-13	22	-		
V-15-10	2	-		
VIII- 7- 3	16	6		
Verkregen	143	10	153	

Tabel 6b. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit bruinzadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in bruin en rood

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Bruin	Rood	Andere (zwart)		
VIII-12- 4	7	4	5		zzBbRR
V- 6- 4	15	2			
VIII- 7- 4	37	8			
V-15- 5	26	11			
V-30- 6	6	2			
VIII- 5- 3	10	7			
V-27- 1	25	14			
Gevonden	126	48		174	$\chi^2 = 0,620$
Verwacht	130,8	43,6			$0.30 < P < 0.50$

$$\chi^2_{0.05} = 3,84 \quad (df = 1).$$

Tabel 7. Overzicht van de voor zaadkleur niet uitsplitsende F<sub>3</sub> lijnen uit roodzadige F<sub>2</sub>'s

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Rood	Andere (zwart/bruin)			
V-13- 1	17	12			zzbbRR
VIII- 7- 6	52	1			
V-12-11	11	1			
V-27-14	7	-			
VIII- 5-11	28	-			
VIII-12- 3	23	-			
V-27-10	19	1			
Totaal	157	15		172	

zwarte zaden die enigszins beschadigd zijn, ziet men vaak een rode grondkleur, wat de hypothese dat R de basiskleur-factor is steunt.

De ouders (P) van de kruising African Red x Blackeye kunnen de volgende constitutie hebben gehad:

P<sub>1</sub> = zzbbRR (Rood)  
P<sub>2</sub> = ZZBBRR (Zwart)

De F<sub>1</sub> en F<sub>2</sub> zien er dan aldus uit:

F<sub>1</sub> : ZzBbRR (zwart)  
F<sub>2</sub> : 12/16 Z...RR (zwart)  
      3/16 zzB.RR (bruin)  
      1/16 zzbbRR (rood)

In de F<sub>2</sub> werden de volgende aantallen planten verkregen: 207 zwart, 31 bruin en 12 rood (tabel 8a). Deze aantallen wijken sterk af van de verwachte waarden

( $\chi^2 = 8,25$  ;  $0.01 < p < 0.02$ ).

De "spontane" zwarte zaden gevonden bij Blackeye splitsten zowel in de F<sub>2</sub> als in de F<sub>3</sub> geen rood uit. De ouders en de F<sub>1</sub> en F<sub>2</sub> zouden de volgende genotypen kunnen hebben gehad:

P<sub>1</sub> = ZZBBRR (zwart)  
P<sub>2</sub> = zzBBRR (bruin)  
F<sub>1</sub> : ZzBBRR (zwart)  
F<sub>2</sub> = 3/4 Z.BBRR (zwart)  
      1/4 zzBBRR (bruin)

Ook hier werd een significante afwijking van de verwachte waarden gevonden bij een kritiek gebied van 5%; zie tabel 8b:  $\chi^2 = 4,87$  ;  $0.02 < p < 0.05$ .

Gebaseerd hierop zou een tweede hypothese kunnen zijn dat naast ZZ een tweede, recessieve factor, z<sub>2</sub>z<sub>2</sub> voor "zwart" aanwezig is. Dit gen komt alleen tot uiting bij afwezigheid van Z (verder Z<sub>1</sub> te noemen). In aanwezigheid van z<sub>2</sub>z<sub>2</sub> komen bruin en rood niet tot uiting.

Volgens deze hypothese worden de volgende splitsingen in de F<sub>2</sub> verwacht:

- (i) African Red x Blackeye : 48/64 Z<sub>1</sub> ..... (zwart)  
                                  9/64 z<sub>1</sub>z<sub>1</sub>B ....Z<sub>2</sub>.. (bruin)  
                                  3/64 z<sub>1</sub>z<sub>1</sub>bbRRZ<sub>2</sub>.. (rood)  
                                  4/64 z<sub>1</sub>z<sub>1</sub>..... z<sub>2</sub>z<sub>2</sub> (zwart)
- (ii) "spontaan" zwart zaad : 48/64 Z<sub>1</sub> ..... (zwart)  
                                  12/64 z<sub>1</sub>z<sub>1</sub>BB..Z<sub>2</sub>.. (bruin)  
                                  4/64 z<sub>1</sub>z<sub>1</sub>.....z<sub>2</sub>z<sub>2</sub> (zwart)

In beide gevallen werden zeer goede overeenkomsten tussen de "gevonden" en "verwachte" waarden verkregen (zie tabellen 8a en 8b).

In de F<sub>3</sub> werd echter i.h.a. een betere overeenkomst met de uitgangshypothese gevonden, zodat de verschillende mogelijkheden in verder onderzoek nader vergeleken moeten worden.

Tabel 8a. Overzicht van de  $F_2$ -lijnen uit zwartzadige  $F_1$ 's, afkomstig van kruisingen tussen African Red en Blackeye, uitsplitsend in zwart, bruin en rood.

$F_1$ -lijnen Lijnen V t/m VIII:	Uitsplitsing $F_2$ -lijnen			Totaal
	Zwart	Bruin	Rood	
Gevonden	207	31	12	250
Verwacht (12:3:1)	187,50	46,88	15,63	
Verwacht (52:9:3)	203,32	35,19	11,73	

$$x^2(12 : 3 : 1) = 8,25 ; 0,02 < P < 0,01$$

$$x^2(52 : 9 : 3) = 0,58 ; 0,70 < P < 0,80$$

$$x^2_{0.05} = 5,99 \quad (df = 2).$$

Tabel 8b. Overzicht van de  $F_2$ -lijnen uit "spontane" zwartzadige  $F_1$ 's uitsplitsend in zwart en bruin.

$F_1$ -lijnen Lijnen I t/m IV:	Uitsplitsing $F_2$ -lijnen		Totaal
	Zwart	Bruin	
Gevonden	292	73	365
Verwacht (3:1)	273,75	91,25	
Verwacht (52:12)	296,40	68,40	

$$x^2(3 : 1) = 4,87 ; 0,02 < p < 0,05$$

$$x^2(52:12) = 0,36 ; 0,50 < p < 0,70$$

$$x^2_{0.05} = 3,841 \quad (df = 1).$$

## 5.6. OVERERVING VAN ZAADHUIDPATRONEN

In het onderzochte materiaal werden de zaadhuidpatronen effen, bont, groot oog, middelgroot oog, klein oog en Watson gevonden (zie beschrijving van de verkregen zaadhuidtypen en foto's).

De verschillende typen gaven in de F<sub>3</sub> de volgende splitsingen te zien:

- Effen : 1. Splitst niet uit (slechts in 1 of 2 gevallen gevonden; dit zou in overeenkomst zijn met de verwachting dat maar 1/16 homozygoot WWHH is).  
2. Splitst uit in:  
a. Effen en bont (1 : 1; tabel 9a),  
b. Effen en Watson (3 : 1; tabel 9b)  
c. Effen, bont, groot oog (+ middelgroot oog), klein oog en Watson (E : B : G.O. : K.O. : W = 9 : 1 : 2 : 1 : 3; zie tabel 9c).
- Bont : Splitst niet meer uit (tabel 10).
- Groot oog  
(+ Mid. oog): Splitst uit in: bont, groot oog, klein oog (1 : 2 : 1; tabel 11).
- Klein oog : Splitst niet meer uit (tabel 12).
- Watson : 1. Splitst niet meer uit (tabel 13a).  
2. Splitst uit in Watson en klein oog (3 : 1; tabel 13b).

Deze resultaten wettigen de volgende aannamen:

- (i) Effen ontstaat door gecombineerde (complementaire) werking van de genen W (= Watson) en H (= Holstein of Bont). Effen kan dus de volgende genotypen hebben: WWHH, WwHH, WWHh, WwHh;
- (ii) Bont is wwHH en klein oog is ww hh; groot oog is intermediair tussen bont en klein oog: wwHh;
- (iii) Watson is W.hh.

De Oudertypen en de F<sub>1</sub> waren: P<sub>1</sub> = WWHH (effen)  
P<sub>2</sub> = ww hh (klein oog)  
F<sub>1</sub> = WwHh (effen)

In de F<sub>2</sub> wordt de volgende uitsplitsing verwacht:

9/16	W.H.	(effen)
1/16	wwHH	(bont)
2/16	wwHh	(groot oog)
1/16	ww hh	(klein oog)
3/16	W.hh	(Watson)

In de lijnen I t/m IV werd in de F<sub>2</sub> een goede overeenkomst gevonden met deze uitsplitsing (zie tabel 14a). In de lijnen V t/m VIII echter was het aantal effen planten te klein, terwijl vooral klein oog veel te sterk was vertegenwoordigd (zie tabel 14b). Een uitleg voor deze afwijking werd nog niet gevonden.

Stel dat een extra factor voor "oog" wordt ingevoerd welke in homozygoot recessieve vorm steeds, onafhankelijk

Tabel 9a. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit effen-zadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in effen en bont

F <sub>2</sub> -lijnen: I t/m IV	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Effen	Bont	Andere		
II- 8- 7	42	14	2		WwHH
I-31-19	30	12	-		
III-40-26	16	5	-		
Gevonden	88	31		119	
Verwacht	96,75	32,25			

$$x^2 = 0,84; 0,3 < P < 0,5$$

$$x^2_{0.05} = 3,841 \text{ (df = 1)}$$

F <sub>2</sub> -lijnen: V t/m VIII	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Effen	Bont	Andere		
VIII-17-3	44	11	2		WwHH
V-26-4	34	12	3		
Gevonden	78	23		101	
Verwacht	75,75	25,25			

$$x^2 = 0,014; 0,90 < P < 0,95$$

$$x^2_{0.05} = 3,841 \text{ (df = 1)}$$

Tabel 9b. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit effen-zadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in effen en Watson

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Effen	Watson	Andere		
III-36-7	29	11	-	40	WwHh
Verwacht	30	10	-		

$$x^2 = 0,13; 0,70 < P < 0,80$$

$$x^2_{0.05} = 3,84 \text{ (df = 1)}$$

Tabel 9b. (vervolg)

F <sub>2</sub> -lijnen	Effen	Watson	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
VI-11- 9	8	5	1		WwHh
V-12-11	7	4	1		
Gevonden	15	9	-		
Verwacht	18	6			

$$\chi^2 = 2,00; 0,10 < P < 0,20$$

$$\chi^2_{0.05} = 3,84 \text{ (df = 1)}$$

Tabel 9c. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit effen-zadige F<sub>2</sub>'s uitsplitsend in effen, bont, groot oog, klein oog, Watson.

F <sub>2</sub> -lijnen: I <sup>2</sup> t/m IV	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen						Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Effen	Bont	Gr.oog	Kl. oog	Watson	Andere		
III-14- 2	27	2	6	6	13		232	WwHh
III-36- 6	40	-	5	2	12			
III-36-19	34	3	5	4	11	2		
III-36-34	33	6	7	6	10			
Gevonden	134	11	23	18	46			
Verwacht	130,5	14,50	29	14,50	43,50			

$$\chi^2 \chi^2 = 3,17; 0,50 < P < 0,170$$

$$\chi^2_{0,05} = 9,488; \text{ (df = 4)}$$

F <sub>2</sub> -lijnen: V <sup>2</sup> t/m VIII	Effen	Bont	Gr. oog	Kl.oog	Watson	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype I
V-13- 6	20	-	9	3	14		214	WwHh
V-12-10	27	1	3	1	5			
VIII-12- 4	8	-	2	3	3			
VIII-12-13	18	-	3	3	9			
V-13- 1	10	-	5	4	10			
VIII- 7 6	27	4	8	3	11			
Gevonden	110	5	30	17	52			
Verwacht	120,375	13,375	26,75	13,375	40,125			

$$\chi^2 = 11,02; 0,02 < P < 0,05$$

$$\chi^2_{0.05} = 9,488; \text{ (df = 4)}$$

Tabel 10. Overzicht van de voor zaadpatroon niet uitsplitsende F<sub>3</sub>-lijnen uit F<sub>2</sub>'s met bont zaadpatroon.

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen			Voorgesteld genotype F <sub>2</sub> :
	Bont	Andere	Totaal	
III-14- 3	65	-		wwHH
III-36-28	11	-		
III-30- 5	57	4		
III-40-21	26	2		
III-40-28	3	-		
II- 4- 1	60	-		
I-34-16	60	3		
IV-21-37	6	-		
Gevonden	288	9	297	

F <sub>2</sub> -lijnen	Bont	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub> :
V-38- 2	39	3		wwHH
V-27- 4	13	-		
VIII-14- 7	19	23		
VIII-21-10	33	1		
VIII-20-10	14	-		
VIII-20-11	38	-		
VIII-21-13	20	2		
Gevonden	176	29	205	



Tabel 11. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit F<sub>2</sub>'s met groot-oog zaadpatroon uitsplitsend in bont, groot oog en klein oog.

F <sub>2</sub> -lijnen	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen					Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Bont	Groot oog	Klein oog	Andere	Totaal	
II- 4- 3	7	19	9	-		wwHh
II- 8-32	6	15	7	-		
III-36- 9	10	20	7	-		
II- 8-10	19	26	16	-		
III-36- 4	10	25	21	3		
III-36-20	10	35	16	-		
II- 7-19	2	2	1	-		
III-14- 7	7	12	2	-		
III-36-15	16	26	11	2		
Gevonden	87	180	90		357	
Verwacht	89,25	179,5	89,25			

$$x^2 = 0,092; 0,95 < P < 0,98$$

$$x^2_{0,05} = 5,991; df = 2$$

F <sub>2</sub> -lijnen	Bont	Groot oog	Klein oog	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
VIII-21- 1	2	6	4	1		wwHh
V-27- 9	8	20	17	3		
V-12- 2	15	13	7	3		
V-27-11	4	14	6	-		
VIII-26- 3	7	23	14	-		
VIII-20- 9	8	18	11	-		
V-30- 6	2	4	2	-		
V-27- 1	3	22	14	-		
VIII- 7- 3	2	12	6	2		
VIII- 5-11	8	11	9	-		
Gevonden	59	143	90		292	
Verwacht	73	146	73			

$$x^2 = 6,71; 0,02 < P < 0,05$$

$$x^2_{0,05} = 5,99; df = 2$$

Tabel 12. Overzicht van de voor zaadpatroon niet uitsplitsende  $F_3$ -lijnen uit  $F_2$ 's met klein-oog zaadpatroon.

$F_2$ -lijnen:	Uitsplitsing $F_3$ -lijnen			Voorgesteld genotypé $F_2$ :
	Klein oog	Andere	Totaal	
I-31-14	36	11		wwhh
II- 4-30	43	2		
II- 8-16	33	4		
III-36-30	42	1		
II- 8- 4	52	2		
Gevonden	206	20	226	

$F_2$ -lijnen:	Klein oog	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype $F_2$ :
V-26- 1	55	5		wwhh
VIII-21- 5	15	1		
V-27- 8	16	1		
VIII- 5 3	17	-		
Gevonden	103	7		

Tabel 13a. Overzicht van de voor zaadpatroon niet uitsplitsende  $F_3$ -lijnen uit  $F_2$ 's met Watson zaadpatroon.

$F_2$ -lijnen	Uitsplitsing $F_3$ -lijnen			Voorgesteld genotype $F_2$
	Watson	Andere	Totaal	
III-36-1	45	3		WWhh
VI-36-11	54	1		
III-40- 4	47	1		
III-20- 5	20	-		
III-36-10	25	3		
Gevonden	191	8	199	

Tabel 13a. (vervolg)

F <sub>2</sub> -lijnen	Watson	Andere	Totaal	Voorgesteld genotype F <sub>2</sub> :
VIII-20- 4	46	-		WWhh
V-13- 4	20	1		
V-15- 6	41	3		
VIII- 5- 8	48	-		
V- 6- 4	15	2		
VIII- 7- 4	45	-		
V-15- 5	36	1		
VIII- 5- 7	31	1		
VIII-12- 3	23	-		
Gevonden	305	8		

Tabel 13b. Overzicht van de F<sub>3</sub>-lijnen uit F<sub>2</sub>'s met Watson zaadpatroon, uitsplitsend in Watson en klein oog.

F <sub>2</sub> -lijnen I t/m V	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen				Voorgesteld genotype F <sub>2</sub>
	Watson	Klein oog	Andere	Totaal	
II- 7- 1	37	20	-		Wwhh
II- 7- 2	24	9	1		
III-36-14	29	10	2		
III-40- 7	16	6	-		
III-40-11	27	5	-		
II- 8-18	19	9	3		
III-40- 1	16	7	1		
Gevonden	168	66		234	
Verwacht	175,50	58,50			

$$\chi^2 = 1,28; 0,20 < P < 0,30$$

$$\chi^2_{0,05} = 3,84; df = 1$$

F <sub>2</sub> -lijnen V t/m VIII	Watson	Klein oog	Andere	Totaal
V-27-10	14	5	1	19
Verwacht	14,25	4,75		

$$\chi^2 = 0,02; 0,80 < P < 0,90$$

$$\chi^2_{0,05} = 3,84; df = 1$$

Tabel 14a. Overzicht van de F<sub>2</sub>-lijnen uit effen zādige F<sub>1</sub>'s afkomstig van kruisingen tussen African Red en Black-eye, uitsplitsend in effen, bont, groot oog, klein oog, Watson.

F <sub>2</sub> -lijnen: V t/m VIII	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen					Totaal
	Effen	Bont	Groot oog	Klein oog	Watson	
Gevonden	103	19	38	28	59	247
Verwacht (9:1:2:1:3)	138,96	15,44	30,88	15,44	46,32	

$$\chi^2 = 25,47; P < 0,001; df = 4$$

$$\chi^2_{0,05} = 9,488; df = 4$$

Tabel 14b. Overzicht van de F<sub>2</sub>-lijnen uit "spontane" effen-zādige F<sub>1</sub>'s, uitsplitsend in effen, bont, groot oog, klein oog, Watson.

F <sub>2</sub> -lijnen: I t/m IV	Uitsplitsing F <sub>3</sub> -lijnen					Totaal
	Effen	Bont	Groot oog	Klein oog	Watson	
Gevonden	195	25	58	23	67	368
Verwacht (9:1:2:1:3)	207	23	46	23	69	

$$\chi^2 = 4,06; 0,30 < P < 0,50; df = 4$$

$$\chi^2_{0,05} = 9,488; df = 4$$

van andere factoren, klein oog geeft. Dan wordt de verhouding: E : B : G.O. : K.O. : W = 27 : 3 : 9 : 16 : 9. Het kleinere aantal effen en bonte planten zou in dit geval kloppen, maar er treedt dan een aanzienlijk tekort aan klein oog en groot oog op.

Bij bont werden in de F<sub>2</sub> graduele verschillen in gekleurd oppervlak (<50%, ongeveer 50%, >50%) gevonden, die ook in de F<sub>3</sub> tot uiting komen (zie tabel 15). Dit zou kunnen berusten op de werking van een modificerende factor die op H<sub>1</sub> niveau de grootte van het oog beïnvloedt.

Dus:	27/64	W.H <sub>1</sub> .H <sub>2</sub> .	(effen)
	9/64	W.H <sub>1</sub> .h <sub>2</sub> h <sub>2</sub>	(effen)
	1/64	wwH <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	(bont > 50%)
	2/64	wwH <sub>1</sub> H <sub>1</sub> H <sub>2</sub> h <sub>2</sub>	(bont ± 50%)
	1/64	wwH <sub>1</sub> H <sub>1</sub> h <sub>2</sub> h <sub>2</sub>	(bont < 50%)
	2/64	wwH <sub>1</sub> h <sub>1</sub> H <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	(groot oog)
	4/64	wwH <sub>1</sub> h <sub>1</sub> H <sub>2</sub> h <sub>2</sub>	(groot oog)
	2/64	wwH <sub>1</sub> h <sub>1</sub> h <sub>2</sub> h <sub>2</sub>	(middel oog)
	4/64	wwh <sub>1</sub> h <sub>1</sub> ..	(klein oog)
	12/64	W.h <sub>1</sub> h <sub>1</sub> ..	(Watson)

Echter verklaart deze aanname niet het optreden van F<sub>3</sub>-planten met >50% kleuring uit F<sub>2</sub>-lijnen met minder dan 50% kleuring.

Ook de bij Watson gevonden intensiteitsverschillen lijken althans ten dele overervend. Naarmate de F<sub>2</sub> donkerder was, nam ook het percentage donker aangelopen F<sub>3</sub>-planten toe. Zie tabel 16.

Verder onderzoek hiernaar is noodzakelijk.

Tabel 15. Verband tussen de mate van kleuring in de F<sub>2</sub> en in de F<sub>3</sub> bij bontzadige lijnen; A < 50% zwart; B ± 50% zwart; C > 50% zwart.

BONT

F <sub>2</sub> -lijnen (A)	F <sub>3</sub> uitsplitsing:			% > 50% bont
	< 50%	± 50%	> 50%	
VIII-14- 7	9	4	3	
VIII-21-13	11	8	1	
V-15- 7	1	-	-	
Totaal	21	12	4	11
F <sub>2</sub> -lijnen (B)	< 50%	± 50%	> 50%	
V-27- 4	13%	-	-	
V-38- 2	38	7	-	
Totaal	51	7	-	0
F <sub>2</sub> -lijnen (C)	< 50%	± 50%	> 50%	
V-12- 8	1	1	-	
VIII-20-11	16	17	5	
VIII-20-10	9	-	5	
VIII-21-10	2	8	23	
Totaal	28	26	33	38

Tabel 16. Verband tussen de intensiteit van Watson-kleuring in de F<sub>2</sub> en de F<sub>3</sub>

Watson

F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub> uitsplitsing			
<u>zeer licht grijs</u>	zeer licht licht grijs	grijs	donker/zeer donker grijs	% (zeer) donker grijs
V-26-5	16	5	-	0
<u>licht grijs</u>				
V-27-3	3	8	5	31
<u>grijs</u>				
V-26-9	14	12	6	
V-12-4	4	5	11	
V-15-6	30	1	8	
V-13-4	<u>5</u>	<u>3</u>	<u>7</u>	
	53	21	32	30
<u>zeer donker grijs</u>				
VIII-20-4	6	17	23	50

6. LITERATUUR.

- ANONYMUS, 1969. Natuurlijke bastaardering bij *Vigna unguiculata* (L) WALP. CELOS Kwartaalverslagen 9: 46-47.
- ANONYMUS, 1969. Natuurlijke bastaardering bij *Vigna unguiculata* (L) WALP. CELOS Kwartaalverslagen 10: 55-57.
- ANONYMUS, 1969. Natuurlijke bastaardering bij *Vigna unguiculata* (L) WALP. CELOS Kwartaalverslagen 11: 48-49.
- ANONYMUS, 1969. Natuurlijke bastaardering bij *Vigna unguiculata* (L) WALP. CELOS Kwartaalverslagen 12: 45-46.
- ANONYMUS, 1970. Overerving van zaadhuidkleur bij *Vigna unguiculata* (L) WALP. CELOS Kwartaalverslagen 15: 20-21.

- HAIGH, J.C. & J.V. LOCHRIE, 1929. Investigation of a Mendelian ratio in *Vigna sinensis* by a consideration of the progeny from successive daily crosses. *Ann Bot.*, 43: 783-803.
- HARLAND, S.C., 1919. Inheritance of certain characters in the cowpea (*Vigna sinensis*) I. *J. Genet.*, 8: 101-132.
- HARLAND, S.C., 1920. Inheritance of certain characters in the cowpea (*Vigna sinensis*) II. *J. Genet.*, 10: 193-205.
- HARLAND, S.C., 1922. Inheritance of certain characters in the cowpea (*Vigna sinensis*) III. *J. Genet.*, 12: 254.
- OSTENDORF, F.W., 1962. Nuttige planten en sierplanten in Suriname, *Bull. Landb. proefst. Suriname* 79: p. 91.
- PURSEGLOVE, J.W., 1966. *Tropical Crops, Dicotyledons I.* Longmans, Green and Co. Ltd. pp. 321-328.
- SAUNDERS, A.R., 1959. Inheritance in the cowpea (*Vigna sinensis* ENDB.): I. Colour of the seed coat. *S. Afr. J. agric. Sci.*, 2: 285-307.
- SAUNDERS, A.R., 1960. Inheritance in the cowpea (*Vigna sinensis* ENDB.): II. Seed coat colour pattern; flower, plant and pod colour. *S. Afr. J. agric. Sci.*, 3: 141-162.
- SEN, N.K. & BHOWAL, J.G., 1961. Genetics of *Vigna sinensis* (L) Savi. *Genetica*, 32: 247-266.
- SMITH, F.L., 1956. Inheritance of the seed coat colour genes in *Vigna sinensis* Savi. *Hilgardia*, 24: 279-296.
- WIENK, J.F., 1963. Photoperiodic effects in *Vigna unguiculata* (L) WALP. *Proefschrift, Landb. hogesch., Wageningen.* pp. 1-7.



Landbouwhogeschool-Wageningen  
CENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK IN SURINAME

KIEMPROEVEN MET STUIFMEEL VAN DE BATAAT OP  
VLOEIBARE EN VASTE MEDIA

J.K.L. Sakiman

Verslag van een onderzoek verricht onder leiding  
van Dr. Ir. G.A.M. van Marrewijk

januari 1971

## I N H O U D

	Blz.
1. <u>Samenvatting</u> . . . . .	5
2. <u>Voorwoord</u> . . . . .	5
3. <u>Inleiding</u> . . . . .	6
3.1. Algemene gegevens over de bataat. . .	6
3.2. Incompatibiliteit en de . . . . . stuifmeelkorrel . . . . .	6
3.3. Stuifmeelkieming in vitro . . . . .	8
4. <u>Stuifmeelkieming in vitro bij de bataat.</u> .	10
4.1. Inleiding en probleemstelling . . . .	10
4.2. Materiaal en methoden . . . . .	11
5. <u>Resultaten en bespreking</u> . . . . .	13
5.1. Algemeen. . . . .	13
5.2. Kieming op filtreerpapier . . . . .	14
5.3. Kieming in hoge suikerconcentraties .	19
5.4. Kieming op agar . . . . .	19
5.5. Kieming in stempelextract . . . . .	25
5.6. Discussie . . . . .	25
6. <u>Literatuur</u> . . . . .	26

## 1. SAMENVATTING

Bij de bataat, *Ipomoea batatas* (L.) Poir. treedt na zelf- of kruisbestuiving slechte zaadzetting op. Dit bemoeilijkt de generatieve vermeerdering en het veredelingswerk. In het gewas komen steriliteits- zowel als incompatibiliteits-mechanismen voor.

Om de aandelen van de componenten incompatibiliteit en steriliteit te scheiden is in maart 1969 begonnen met een onderzoekprogramma. Een onderdeel hiervan is het onderzoek naar kiembaarheid van het stuifmeel in vitro.

Stuifmeelkieming werd nagegaan in een veelheid van vloeibare en vaste voedingsmedia. Naast een basismedium van anorganische zouten werden verschillende concentraties saccharose en boorzuur aan het medium toegevoegd. Aan een aantal saccharoseboorzuur oplossingen werden ook stempel-extracten van een compatibele partner toegevoegd.

In het onderzoek werden niet alleen de door MARTIN et al. (1966) beschreven verschijnselen van pseudokieming gevonden. Behalve de door hen genoemde "bursting" en pseudokieming zonder wand, werd ook een vorm van pseudokieming gevonden waarbij de exinewand intact blijft. Verder werden er bij hoge suikerconcentraties en op agar ook enkele vermoedelijke kiembuizen gevonden bij de cultivars Djarak en Hopi. Pseudokieming toont in alle kiemingsmedia een duidelijke negatieve correlatie met het suikergehalte. De invloed van boorzuur op de pseudokieming of kieming is onduidelijk.

Bij verder onderzoek kan het best worden uitgegaan van vrij hoge suikerconcentraties, waaraan groeistoffen (zoals gibberellinen) en/of vitaminen zijn toegevoegd, bij verschillende temperaturen.

## 2. VOORWOORD

Dit verslag heeft betrekking op een onderdeel van het op het CELOS lopende onderzoek naar de vruchtzetting bij de bataat. Het onderzoek werd verricht op het Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek in Suriname in de periode eind mei tot november 1970.

De uitvoering berustte bij J.K.L. Sakiman, studente in de Plantenveredeling aan de Landbouwhogeschool te Wageningen. Zij werd hierbij geassisteerd door de heer A. Doedhnath Fakira, aan wie veel dank is verschuldigd.

De leiding van het onderzoek had Dr. Ir. G.A.M. van Marrewijk.

### 3. INLEIDING

#### 3.1. ALGEMENE GEGEVENS OVER DE BATAAT

*Ipomoea batatas* (L.) Poir. (bataat, sweet potato) behoort tot de familie Convolvulaceae, orde der Tubiflorae.

De bataat is een kruipend of klimmend gewas en heeft wortelknollen. Deze eetbare wortelknollen zijn een belangrijke bron van voedsel. De bladeren en jonge toppen worden wel gebruikt als groente.

De bataat komt voornamelijk voor in tropische gebieden. Zij is waarschijnlijk afkomstig uit tropisch Amerika.

De bataat is een hexaploid ( $2n = 90$ ) en zou ontstaan zijn als amphidiploid uit een tetraploide ( $2n = 60$ ) en een diploide ( $2n = 30$ ) voorouder, waardoor een triploide ( $2n = 45$ ) ontstond, gevolgd door spontane chromosoomverdubbeling (PURSEGLOVE, 1966).

De bataat wordt in het algemeen vegetatief vermeerderd door stekken, waardoor uit elke zaailing een kloon kan worden verkregen. De klonen variëren in de vorm van het blad, kleur van de nerven, stengels, beharing en knollen.

De generatieve vermeerdering bij dit gewas is moeilijk. Ook bij goed bloeiende cultivars is de zaadzetting in het algemeen erg laag.

#### 3.2. INCOMPATIBILITEIT EN DE STUIFMEELEKORREL

Het veredelen van de bataat kan bemoeilijkt worden door 2 factoren: (i) het weinig of niet bloeien van de bataat; (ii) slechte zaadzetting na open of gecontroleerde zelf- of kruisbestuiving.

De lage zaadzetting bij de bataat schijnt veroorzaakt te worden door een complex van incompatibiliteit en steriliteitscomponenten. Een gedeelte van de steriliteit kan veroorzaakt zijn door het abnormale gedrag van de chromosomen tijdens de meiose (TING en KEHR, 1956), maar JONES (1956) concludeerde dat er ook andere oorzaken, zoals ziekte of genetische factoren, moeten zijn. MARTIN (1967) is van mening dat bij bataat algemeen een gedeeltelijke steriliteit (partial sterility) voorkomt. Incompatibiliteit speelt wel een rol, maar deze zou schuil gaan achter een krachtiger en algemener voorkomend steriliteitssysteem.

De aanwezigheid van zelfincompatibiliteit bij de bataat werd vroeg ontdekt (STOUT, 1926, in: MARTIN, 1966). Maar de fysiologische en genetische mechanismen die zelfincompatibiliteit bij de bataat beheersen zijn nog slecht bekend.

Incompatibiliteit wordt heel vaak gevonden in het plantenrijk. FAST (1935) dacht dat zij voorkomt bij meer dan 3000 soorten in 20 families van bloeiende planten. Dit cijfer werd door LEWIS (1954) veel te laag genoemd (zie ALLARD, 1960, p. 238).

Zelfincompatibiliteit is één van de systemen die kruising tussen planten bevorderen. Zij schijnt een belangrijke rol te hebben in de evolutie van bloeiende planten. In tegenstelling tot steriliteit zijn zowel mannelijke als vrouwelijke gameten bij incompatibiliteitssystemen normaal functionerend en niet defect, maar ze zijn in bepaalde combinaties onverenigbaar.

Als zelfbestuiving niet tot bevruchting leidt, wordt dit zelfincompatibiliteit genoemd, terwijl bestuiving tussen 2 planten welke niet tot zaadzetting leidt kruisingsincompatibiliteit heet.

LEWIS (in: ALLARD, 1960, p. 239) onderscheidde homomorfe en heteromorfe incompatibiliteitssystemen. Heteromorfe incompatibiliteit wordt begeleid door morfologische verschillen tussen de reproductieve organen van de combinerende planten. Bij homomorfe incompatibiliteit is dit niet het geval. Hier wordt de incompatibiliteitsreactie van het stuifmeel bepaald door het genotype van de stuifmeelleverende ouderplant (sporofytisch systeem) of door de genetische constitutie van het stuifmeel zelf (gametofytisch systeem). Allebei de typen zijn gebaseerd op de werking en interactie van multipiele allelen van één S-locus; zelden van 2 of meer loci.

Door BREWBAKER (1957) werd een verband gevonden tussen de morfologische kenmerken van pollen, type van incompatibiliteitssysteem en plaats van buisgroei-verhindering. Morfologisch gezien kent men bij Angiospermen twee typen van stuifmeel: binucleaat en trinucleaat. De binucleate korrels hebben een generatieve en een vegetatieve kern. Gedurende de kiembuisgroei deelt de generatieve kern zich om 2 mannelijke gameten te vormen. Bij de trinucleate korrels heeft de deling van de generatieve kern al plaats voor het vrijkomen van het stuifmeel. In planten met binucleaat stuifmeel wordt het gametofytisch incompatibiliteitstype gevonden, en de remming ontstaat gedurende de groei van de kiembuis. Uitzonderingen op deze samenhang vindt men onder de leden van de fam. Gramineae.

Ook PANDEY (1960) bevestigde de relatie gevonden door Brewbaker, maar de veroorzakende redenen van deze relatie en een aantal van uitzonderingen hierop zijn niet duidelijk.

Een bijna volledige samenhang tussen stuifmeelanatomie en plaats van remming is gevonden bij 42 genera van 23 verschillende families (BREWBAKER, 1957). De plaats van remming bij binucleaat stuifmeel is de stijl of het vruchtbeginsel, bij trinucleaat stuifmeel de stempel. Een verklaring hiervoor zou het verschil in hoeveelheid aanwezige stofwisselingsproducten zijn bij bi- versus tri-nucleate stuifmeelkorrels tijdens het vrijkomen (BREWBAKER, 1957). Incompatibiliteit zou dan de sucrose opname of het gehele stofwisselingsstelsel van de mannelijke gametofyt blokkeren.

Trinucleaat stuifmeel zou door de tweede mitotische deling van de generatieve kern reeds een tekort aan sucrose of stofwisselingsprodukten hebben gedurende de microsporangese. In tegenstelling hiermee zijn de binucleate korrels relatief rijk aan stofwisselingsprodukten tijdens het vrijkomen. De beperkte hoeveelheid beschikbare sucrose zou bij trinucleaat stuifmeel remmend werken op het kiemen. Binucleaat stuifmeel kiemt wel, maar de stuifmeelbuisgroei houdt op zodra de metabolietenvoorraad in de korrel opgebruikt is.

Bij bataat is enige heterostylie wel gevonden (POOLE 1952, VAN SCHREVEN 1954, YEN 1961; in: WILLIAMS en COPE, 1967), maar dit zou niet in verband staan met de expressie van incompatibiliteit. Volgens MARTIN (1967) zijn er geen aanwijzingen dat er enig verband is tussen de lengtevariatie van de stijl en de incompatibiliteit bij de bataat en heeft dit gewas een homomorf incompatibiliteitssysteem. MARTIN (1965) suggereerde tevens dat bij bataat sprake zou zijn van sporofytische incompatibiliteit. TOGARI et al. (1942; in BREWABKER, 1957) waren van mening dat de bataat trinucleaat stuifmeel heeft en dat de plaats van remming de stempel is.

### 3.3. STUIFMEELKIEMING IN VITRO

#### 3.3.1. Inleiding

Om enig inzicht te krijgen in de mechanismen van incompatibiliteit en steriliteit is systematisch onderzoek van het stuifmeel noodzakelijk. Een onderdeel hiervan is de kiembaarheid van stuifmeel in vitro.

Over de te gebruiken kiemingsmedia bestaat in de literatuur geen overeenstemming. Duidelijk is echter dat water nodig is voor het kiemen van de pollenkorrel. De functie van het medium is dus in de eerste plaats om voor een voldoende watervoorraad te zorgen. Water of waterdamp alleen schijnt in enkele gevallen reeds voldoende te zijn voor kieming (zie VISSER, 1955). Maar in het algemeen zijn er voor kieming complementaire voedingsstoffen nodig, o.a. suiker, borium en calcium. Ook andere factoren zoals temperatuur en pH schijnen de kieming te beïnvloeden.

#### 3.3.2. De functie van suiker bij de kieming

De rol van suiker bij de kieming is een veel besproken vraagstuk. Het is bekend dat autotrofe planten of plantenweefsels die chlorophyl bevatten, koolhydraten kunnen vormen waarop hun groei en ontwikkeling is gebaseerd. In de afwezigheid van chlorophyl worden deze planten echter parasitair of saprofytisch en moeten hun voeding van andere bronnen halen. Als regel bevatten stuifmeelkorrels geen chlorophyl. Hierdoor zijn zij afhankelijk van uitwendige bronnen voor de toevoer van organische bouwstoffen.

Op het moment van vrijkomen bevat het stuifmeel enig reservevoedsel dat het gebruikt tijdens de kieming. Maar dit zou niet genoeg zijn voor de groei van kiembuizen. Het bovenstaande zou kunnen betekenen dat suiker als voedingsstof dient gedurende de kiembuisgroei. Sommige auteurs (o.a. VISSER, 1955) denken echter dat de enige functie van suiker bestaat in het reguleren van osmotische druk van de vloeistof, en dat de kiembuis uitsluitend opgebouwd wordt uit reservevoedsel van de stuifmeelkorrel. O' KELLEY (1955) die met  $C^{14}$  gelabelde suikers gebruikte keurde de theorie van volledig endogene voeding van de stuifmeelbuis af en bewees dat stuifmeelbuizen de suiker uit de voedingsoplossing gebruikten. VASIL (1960) kon aantonen dat er een positieve correlatie bestaat tussen de suikerconcentratie en zowel het kiemingspercentage als de lengte van buizen. De concentratie van sucrose voor optimale kieming varieert duidelijk van soort tot soort, zelfs van cultivar tot cultivar.

### 3.3.3. De functie van boorzuur

In het algemeen werd gevonden dat boorzuur nodig is voor de kieming. Het stimulerende effect werd ontdekt door SCHMUCKER (1935). Volgens VASIL (1960) is de rol van boron:

- (i ) het bevorderen van absorptie van suiker in het stuifmeel voor metabolische processen door vorming van suiker-boraat complexen;
- (ii ) het verhogen van zuurstofopname;
- (iii) het leveren van een bijdrage aan de synthese van pectinemateriaal voor de wand van de actief groeiende stuifmeelbuis.

O' KELLEY (1955) vond dat stuifmeel tijdens het vrijkomen meestal arm is aan boorzuur en dat daarom toevoeging van boorzuur nodig zou zijn voor verbetering van de kieming.

VISSER (1955) was van mening dat stuifmeel gevoelig is voor boorzuur (afhankelijk van het borium-niveau van de plant waarvan het stuifmeel afkomstig is), voor de osmotische waarde en voor de temperatuur van het medium. Een hoge osmotische waarde zou even goede kieming geven als toevoeging van borium.

DANIEL en VÁROCZY (1957; in: TUPY, 1960) wezen erop dat boron de activiteit van adenosinetrifosfaat zou stimuleren.

### 3.3.4. Andere beïnvloedende factoren

BREWBAKER en KWACK (1960) vonden dat Ca een essentiële factor is voor stuifmeelkieming en kiembuisgroei. De verbetering van kieming en groei van stuifmeel door Ca hangt samen met de binding van Ca aan pectine-carbonylgroepen langs de wand van de stuifmeelbuis. Incompatibiliteitsreacties zouden de binding van Calcium aan de pectine van de celwand belemmeren.

VASIL (1960) vond dat Ca-nitraat en Mg-sulfaat de kieming verbeteren. Ook gibberelline-zuur heeft bij sommige planten een duidelijk effect op de verlenging van de stuifmeelbuizen.

Volgens VISSER (1955) is er een andere optimum-temperatuur bij elk boorzuur- en suikergehalte. Ook de concentratie van het stuifmeel en toevoeging van vreemd stuifmeel schijnen soms een zeer gunstig effect te hebben. Stuifmeelkorrels zouden een stof (of stoffen) afscheiden in het medium, die de kieming stimuleert.

#### 4. STUIFMEELKIEMING IN VITRO BIJ DE BATAAT

##### 4.1. INLEIDING EN PROBLEEMSTELLING

De genetische en fysiologische mechanismen die de zelfincompatibiliteit en steriliteit in de bataat controleren zijn nog vrij slecht bekend. Daar incompatibiliteit gewoonlijk veroorzaakt wordt door een fysiologische interactie van het stuifmeel of de stuifmeelbuizen met het weefsel van de stempel en de stijl, is het gedrag van stuifmeel in vivo en in vitro van speciale betekenis in het onderzoek van zelfincompatibiliteit. Ook zijn uit dit gedrag gevolgtrekkingen over de mate van stuifmeelfertiliteit te halen.

Als aangenomen wordt dat bij bataat een homomorf incompatibiliteitsysteem werkzaam is (MARTIN, 1967), kan één van de volgende verschijnselen voorkomen als normaal functionerendstuifmeel op de stempel valt:

- (i ) het stuifmeel kiemt niet of nauwelijks;
- (ii ) de pollenbuis groeit tot in de stijl, maar wordt hier geremd;
- (iii) de pollenbuis groeit tot aan of in het vruchtbeginsel, echter zonder dat bevruchting plaats heeft.

Bij de bataat schijnt een belangrijk fysiologische mechanisme van de incompatibiliteit het niet kiemen van stuifmeel op de stempel te zijn (TOGARI et al., 1942; in: MARTIN et al., 1966). FUJISE (in MARTIN et al., 1966) vond dat batatestuifmeel niet kiemde in vitro. Volgens hem zouden de stempels stimulerende stoffen bezitten die de kieming bevorderen, maar deze zouden alleen in werking komen wanneer de remmende stoffen van de stempel geneutraliseerd worden door complementaire stoffen van het stuifmeel. Zelf- of kruisingsincompatibiliteit zou dan voorkomen wanneer het stuifmeel geen enkele complementaire stof bezit.

MARTIN et al. (1966) vonden dat stuifmeelkorrels van de bataat en verwante soorten niet kiemen op een grote verscheidenheid van vloeibare en vaste media. Dit hoeft volgens hen niet te wijzen op de noodzaak van specifieke stimulerende stoffen. Het niet kiemen in vitro zoals bij bataat is namelijk karakteristiek voor trinucleaat stuifmeel en sporofytische beheersing van de



incompatibiliteit. Zij vonden enkele gevallen van kieming bij *Meremia umbellata*, een met *Ipomoea batatas* verwante soort en dit zou erop kunnen wijzen dat het mogelijk is om in vitro kieming te krijgen bij goedgekozen voedingsmedia en milieuomstandigheden. MARTIN et al. (1966) gebruikten als kiemingsmedium een variant van een standaardoplossing volgens BREWBAKER et al. (1963), welke sucrose en zouten van B, Ca, Mg en K bevatte.

#### 4.2. MATERIAAL EN METHODEN

Voorafgaand aan het eigen onderzoek was in vitro kieming van stuifmeel op kleine schaal onderzocht door Mej. M.F. Vis. Als media gebruikte zij kraanwater, gedestilleerd water en gedestilleerd water waaraan 12,5, 25, 50 of 100 ppm boorzuur was toegevoegd, een 2% agar-oplossing, 10, 20, 30, 40, 50 of 60% saccharosemedia zonder boorzuur en een suikerboorzuoroplossing (20% saccharose, 30 ppm  $H_3BO_3$ ).

Dit onderzoek werd voortgezet door Mevr. Ir. <sup>3</sup>C. <sup>3</sup>Douwes-Wagenaar. Zij ging uit van een basismedium bestaande uit 300 ppm  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ , 200 ppm  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 ppm  $KNO_3$  in water. Er werden verder aan deze oplossing verschillende hoeveelheden saccharose (0, 5, 10, 15, 20 en 30%) toegevoegd, terwijl elke saccharosetrapp de boorzuurreeks 0,25, 100, 150 en 200 ppm omvatte (ANONYMUS, 1970).

Daar in deze voedingsmedia geen kieming werd gevonden, werd het onderzoek gecontinueerd waarbij de onder 4.2.1. t/m 4.2.4. te bespreken procedures gevolgd werden.

##### 4.2.1. Kieming op filtreerpapier

Daar tot dan toe nog geen vast medium was gebruikt, werd filtreerpapier geprobeerd. Filtreerpapier beïnvloedt door zijn absorberende werking de osmotische waarde van het medium. Volgens VISSER (1955) zou het percentage kieming in relatie staan tot de osmotische en colloïdale eigenschappen van het medium. Stuifmeelkieming zou namelijk afhankelijk zijn van de "diffusion rate of water" dat is de verhouding waarin water vrijgegeven wordt door het medium en opgenomen door het stuifmeel.

Voor het experiment werd uitgegaan van petrischalen met een diameter van 9 cm, waarin filtreerpapier was gelegd. Het filtreerpapier werd verdeeld in vier kwadranten. Gelijke hoeveelheden vloeistof werden dan afgemeten om het filtreerpapier in alle schalen gelijkmatig te bevochtigen. Vooraf was bij een blanco schaal uitgeprobeerd hoeveel vocht nodig is voor bevochtiging zonder dat vrij water aanwezig blijft.

Gebruik werd gemaakt van het standaardmedium 300 ppm  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; 200 ppm  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  en 100 ppm  $KNO_3$  in aqua dest. Hieraan werd 0, 10, 20 of 30% saccharose en 0, 50 of 100 ppm boorzuur toegevoegd. Op deze wijze ontstonden 12 behandelingen, welke op stuifmeel van 4 klonen (Djarak, White Star, Hopi, USA 130) werden toegepast.

Elke behandeling werd in 4 herhalingen uitgevoerd. Mede ter besparing van materiaal werd bij alle behandelingen het stuifmeel van de vier klonen in dezelfde petrischaal, één kloon per kwadrant, gebracht.

Bloemen werden verzameld vóór 9.00 uur 's morgens en opgeslagen in een grote petrischaal met een diameter van 18 cm. Op grond van het o.a. door BREWBAKER et al. (1963) en VISSER (1955) beschreven populatie-effect - weinig stuifmeelkorrels bij elkaar kiemen slechter dan veel bij elkaar - werd steeds het stuifmeel uit alle vijf helmknoppen van een bloem gebruikt. Deze helmknoppen werden met naalden één voor één opengemaakt op het filtreerpapier, zodat al het stuifmeel op het voedingsmedium terecht kwam. De lege helmknoppen werden daarna verwijderd. Om uitdrogen te voorkomen werden de petrischalen bij 24°C in de broedstoom geplaatst.

Beoordeling van de kieming had plaats 1 respectievelijk 4 etmalen na het inzetten. De petrischalen werden bekeken met een Leitz-Laborlux microscoop bij een vergroting van 100 - 400 maal.

#### 4.2.2. Hoge suikerconcentraties met en zonder standaardoplossing

Volgens PFUNDT (1910) en DOROSHENKO (1928), vermeld in BREWBAKER en MAJUMDER (1959), zou trinucleaat stuifmeel moeilijk kiemen en media verkieszen met hoge suikerconcentraties.

Gebaseerd hierop werden voedingsmedia samengesteld met en zonder standaardoplossing waaraan toegevoegd 35, 40, 45, 50, 55 of 60% saccharose en 0, 50 of 100 ppm boorzuur. Hier werden uitgeholde voorwerpsglasjes gebruikt. Enkele druppels kiemingsmedium werden op het voorwerpsglasje gebracht, waarna het stuifmeel op de onder 4.2.1. beschreven wijze in de vloeistof werd overgebracht. Het voorwerpsglasje werd dan voorzichtig afgesloten met een dekglasje, voorzien van een plaketiketje waarop een behandelingsnummer, en vervolgens in een grote petrischaal (diameter: 18 cm) gezet. Om uitdrogen te voorkomen werd er met aqua dest. bevochtigd filtreerpapier in de grote petrischalen gedaan.

Er werden hier 2 herhalingen gedaan met per dag één kloon. Omdat White Star te weinig bloemen had werden alleen de klonen Hopi, Djarak en USA 130 gebruikt.

Aanvankelijk werden de voorwerpsglazen met stuifmeel 24 uur na inzetten bekeken. Toen bleek dat kieming of pseudokieming reeds 2 uur na inzetten zichtbaar is en dat de activiteit heel spoedig ophoudt werd de procedure veranderd. Per dag werd maar één van de behandelingsgroepen met of zonder standaardoplossing in enkelvoud ingezet; de herhaling werd de volgende dag gedaan. Twee uur na inzetten werd begonnen met het bekijken van preparaten met de Leitz-Laborlux microscoop.

#### 4.2.3. Kieming op agar

Volgens VISSER (1955) zou agar (of gelatine) hetzelfde doel hebben als suiker, d.i. de diffusie van water controleren, door haar colloïdale natuur. Hierom werden in de kiemprouven op OXOID-agar 1,2% aanvankelijk dezelfde saccharoseconcentraties gebruikt als bij 4.1.1. Daarna werden ook hogere suikerconcentraties (35, 40, 45%) toegepast. De boorzuurconcentraties bedroegen weer 0, 50 of 100 ppm. Het agarmedium werd in vloeibare vorm op de uitgeholde voorwerpoglaasjes gebracht. Na afkoelen en stollen werd het stuifmeel met een penseel op het medium afgestroken.

Het aantal herhalingen, de gebruikte klonen, en de beoordelingsprocedure corresponderen met die onder 4.2.2.

#### 4.2.4. Kieming in stempelextract

Kiemingsmedium werd gemaakt van stempelextract, waaraan 0, 10, 20, 30, 35, 40 of 45% saccharose werd toegevoegd.

Het stempelextract werd steeds vervaardigd uit een met de onderzochte kloon goed compatibele partner. Eén ml. saccharose-vloeistof werd afgemeten en hierin werden 2 mg stempels (dat is ongeveer 2 stempels) van een kloon in een mortier fijngemaakt. Van dit kiemingsmedium werden enige druppels gepipetteerd op een uitgehold voorwerpoglaasje. Stempelextract werd gewonnen van de klonen Brokopondo (voor Djarak en Hopi) en Centennial (voor USA 130). Het aantal herhalingen en de beoordelingsprocedure correspondeerden ook hier met die onder 4.2.2.

### 5. RESULTATEN EN BESPREKING

#### 5.1. ALGEMEEN

De volgende verschijnselen werden gevonden bij kieming van *Ipomoea batatas* (L) Poir. stuifmeel in vitro:

(i) "Bursting"; hierbij kiemt het stuifmeel niet, maar de celinhoud komt naar buiten, doordat de wand van de stuifmeelkorrel open barst. Dit verschijnsel ziet men algemeen en vaak in kiemingsmedia, welke niet zo goed aangepast zijn aan kieming. VAN TIEGHEM (1869), MOLISCH (1893) en LIDFORS (1896) (vermeld in VISSER, 1955) vonden geen duidelijke relatie tussen het aantal gevallen van "bursting" en het suikergehalte. Dat "bursting" positief gecorreleerd is met de "diffusion rate of water", in het bijzonder bij stuifmeel dat gevoelig is voor een ruime watervoorraad, is aangetoond door ANTHONY et al. (1920), KUHN (1937), RENNER (1919), SCHOCH-BODMER (1936) e.a., (zie VISSER, 1955). Zij vonden dat de hoeveelheid "bursting" vermindert bij toenemende osmotische waarde van het medium.

- (ii) "Pseudokieming"; de celinhoud komt wel buisvormig naar buiten maar heeft geen wand. De cytoplasmaslierten zijn vaak lang en gekronkeld. Als ze een hindernis ontmoeten komen de kronkels dicht bijeen te liggen. De cytoplasmaslierten vertonen een fijnkorrelige structuur (zie foto 1).
- (iii) Een heel andere vorm van pseudokieming is dat een buis uitgroeit nog omgeven door de exinewand. Deze buis is vaak kort en enigszins gekromd van vorm. Een enkele keer is de kernsubstantie duidelijk zichtbaar (zie foto 2 en 3).
- (iv) Echte kieming. Enkele gevallen van vermoedelijke echte kieming werden gevonden op vloeibare kiemingsmedia met verhoogde suikerconcentratie en op agar. Deze waarschijnlijke kiembuizen hebben een duidelijke wand en zijn nagenoeg recht. Het cytoplasma in de buis ziet er regelmatig uit. Wel zijn deze buizen erg kort, doordat de groei al na enkele uren stopt, en er is geen kern zichtbaar (zie foto 4 en 5). Bij het tellen van aantallen "gekiemde" korrels werden "bursting" en "pseudokieming" tezamen in de categorie "pseudokieming" ondergebracht.

## 5.2. KIEMING OP FILTREERPAPIER

De resultaten van de tellingen zijn weergegeven in de tabellen 1 en la.

Het vaststellen van pseudokieming werd hier erg bemoeilijkt door de vele artefacten veroorzaakt door de structuur van het filtreerpapier.

Echte kieming werd niet gevonden, wel eenmaal een uitstulping met intacte exine-wand, waarin de kern duidelijk zichtbaar was. Het gebruikte kiemingsmedium in dit geval bestond uit de standaardoplossing + 10% saccharose + 50 ppm boorzuur.

Er werd geen duidelijk verband gevonden tussen het percentage pseudokieming en de gebruikte kloon of het boorzuurgehalte. Het saccharosegehalte was echter vermoedelijk wel van invloed. De gemiddelde percentages pseudokieming bij 0,10, 20 en 30% saccharose waren respectievelijk 3,06, 17,06, 4,91 en 4,08. Gezien de cijfers kan het aangenomen worden dat minder "bursting" optreedt bij toenemende osmotische waarden.

Het geringe percentage barstende cellen bij 0% saccharose, is misschien veroorzaakt doordat de stuifmeelkorrels "inert" zijn. Suiker zou bijvoorbeeld eerst een bepaalde enzymreactie op gang moeten brengen, welke de exine- of porus-wand geschikt maakt voor extrusie van het cytoplasma. Dit klopt niet met de mening van VISSER (1955) dat suiker alleen de osmotische waarde reguleert.

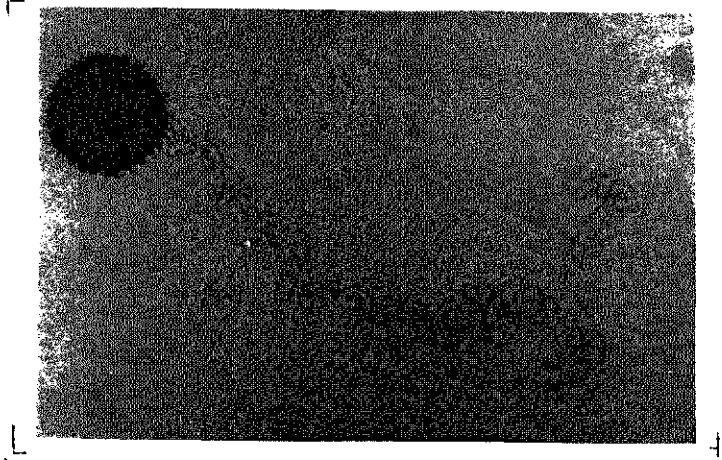


Foto 1. Pseudokieming van *Ipomoea batatas* stuifmeelkorrel op kunstmatig medium (100 x).

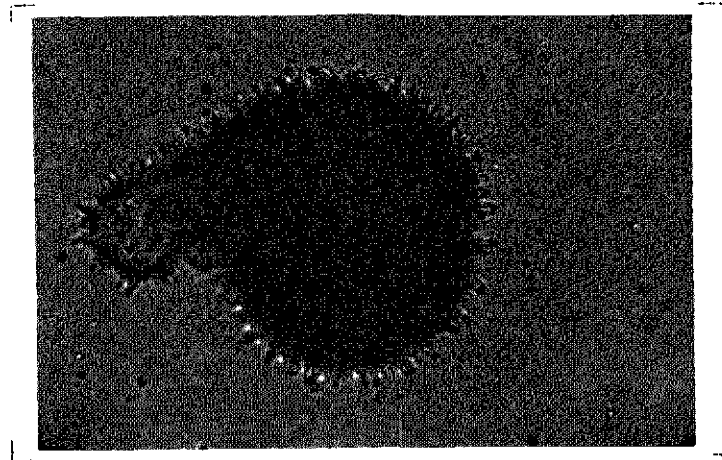


Foto 2. Uitstulping met exine-wand; *Ipomoea batatas* "USA 130" stuifmeelkorrel op aquadestillata + 45% saccharose medium (400 x).

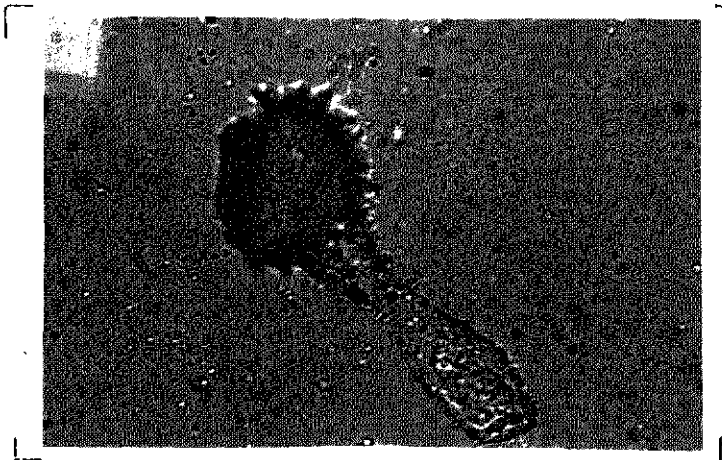


Foto 3. Abnormale kiembuis met kernachtige structuur; *Ipomoea batatas* "USA 130" stuifmeelkorrel, medium: aquadestillata + saccharose 40% + 100 ppm boorzuur. (400 x).

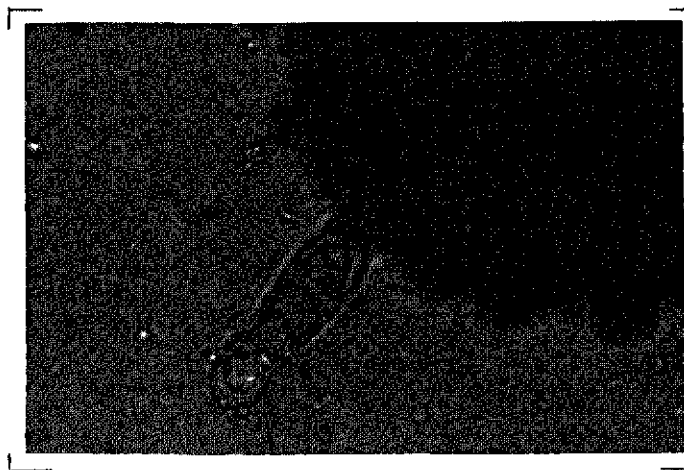


Foto 4. Stuiifmeelkorrel met (vermoedelijk) begin kiembuis;  
Ipomoea batatas "Djarak"; medium: standaardoplossing  
+ saccharose 35% + 50 ppm boorzuur (400 x).



Foto 5. Stuiifmeelkorrel met begin kiembuisvorming;  
Ipomoea batatas "USA 130"; medium: standaard-  
oplossing + saccharose 35% + 1,2% Oxoid agar (400 x).

Tabel 1. Gevonden percentages pseudokieming bij stuifmeel van vier batatecultivars in verschillende kiemingsmedia op filtreerpapier. Alle media met standaardoplossing. B = boorzuur (ppm); S = saccharose (%)

Kiemings- medium Cultivar	OB		OB		OB		OB		5OB		5OB		5OB		5OB		10OB		10OB		10OB		10OB	
	OS	1OS	2OS	3OS	OS	1OS	2OS	3OS	OS	1OS	2OS	3OS	OS	1OS	2OS	3OS	OS	1OS	2OS	3OS	OS	1OS	2OS	3OS
DJARAK	1	1,37	29,91	0,95	8,33	0	26,45	0	0	4,42	49,22	0	0	0	0	0	4,42	49,22	0	0	0	0	0	0
	2	1,80	30,23	0,88	20,80	1,45	37,50	1,98	3,03	0	7,50	0	0	0	0	0	0	7,50	0	0	0	0	0	0,90
	3	6,20	43,75	10,29	0	7,27	8,06	0,94	0	19,35	3,62	4,35	2,97	3,62	4,35	2,97	19,35	3,62	4,35	2,97	3,62	4,35	2,97	2,97
	4	0	12,12	11,02	4,65	0	16,13	6,98	13,04	5,41	16,67	12,99	3,62	16,67	12,99	3,62	5,41	16,67	12,99	3,62	12,99	3,62	3,62	3,62
WHITESTAR	1	0	26,32	0	0	36,84	0	10,00	0	0	23,53	52,94	0	23,53	52,94	0	0	23,53	52,94	0	0	0	0	0
	2	1,01	18,35	6,13	10,31	0	25,00	0	3,77	0	25,00	0	0	0	0	0	0	25,00	0	0	0	0	0	0
	3	7,32	16,82	9,68	2,82	1,99	3,41	0	1,87	4,13	2,82	10,00	0	2,82	10,00	0	4,13	2,82	10,00	0	0	0	0	0
	4	18,57	15,58	7,69	17,00	0	6,57*	9,09	16,15	7,32	6,25	13,98	13,48	6,25	13,98	13,48	7,32	6,25	13,98	13,48	13,98	13,48	13,48	13,48
HOPI	1	0	2,65	0	0	13,19	3,95	5,66	0,84	12,00	0,97	3,37	0,84	12,00	0,97	3,37	0,84	12,00	0,97	3,37	0,84	12,00	0,97	3,37
	2	0	37,04	5,17	1,90	12,50	0,98	0,71	8,59	19,57	0	0	8,59	19,57	0	0	8,59	19,57	0	0	0	0	0	0
	3	0	8,40	8,26	0	7,27	4,20	0	3,48	12,36	0,80	3,64	0,80	12,36	0,80	3,64	0,80	12,36	0,80	3,64	0,80	3,64	0,80	3,64
	4	15,25	18,52	8,62	1,36	0	19,54	3,26	8,04	5,33	28,24	4,55	1,75	28,24	4,55	1,75	5,33	28,24	4,55	1,75	4,55	1,75	1,75	1,75
USA 130	1	0,97	0	0	2,61	1,18	0	0	0	0	15,56	1,05	1,89	15,56	1,05	1,89	0	15,56	1,05	1,89	0	0	0	1,89
	2	0,86	19,58	0,81	0	22,92	0	0	0	12,20	0	0	12,20	0	0	0	0	12,20	0	0	0	0	0	0
	3	1,79	8,22	1,48	2,24	1,98	1,98	1,94	1,43	5,00	19,61	6,25	0	19,61	6,25	0	5,00	19,61	6,25	0	0	0	0	0
	4	1,92	20,37	12,07	23,08	0	1,80	8,93	1,18	5,56	17,64	3,80	0	17,64	3,80	0	5,56	17,64	3,80	0	0	0	0	0

\* = pseudokieming met exine-wand en kern zichtbaar

Tabel 1a. Gemiddelde percentages pseudokieming bij stuifmeel van de in tabel 1 genoemde klonen gerangschikt naar toenemend boorzuurgehalte (horizontaal) en toenemend suikergehalte (verticaal)

Saccharose (%)	Cultivar	Boorzuurgehalte (ppm)			Totaal gemiddeld
		0	50	100	
0	Djarak	2,44	2,18	7,30	3,06
	White Star	6,73	0,50	2,86	
	Hopi	3,56	1,77	4,56	
	USA 130	1,39	0,77	2,64	
	Gemiddeld	3,53	1,31	4,34	
10	Djarak	29,00	22,04	19,25	17,06
	White Star	19,37	17,96	14,40	
	Hopi	16,65	13,13	18,04	
	USA 130	12,04	6,72	16,25	
	Gemiddeld	19,27	14,96	16,99	
20	Djarak	5,79	2,43	4,34	4,91
	White Star	5,88	2,25	19,23	
	Hopi	5,51	3,10	1,33	
	USA 130	3,59	2,72	2,78	
	Gemiddeld	5,19	2,63	6,92	
30	Djarak	8,45	4,02	1,87	4,08
	White Star	7,53	7,95	3,37	
	Hopi	0,82	4,60	2,19	
	USA 130	6,98	0,65	0,48	
	Gemiddeld	5,95	4,31	1,98	



Vele auteurs (o.a. VISSER 1955) vonden dat boorzuur toegevoegd aan het kiemingsmedium de kieming stimuleert en het percentage "bursting" van stuifmeelkorrels vermindert. Dat boorzuur in ons onderzoek geen duidelijk effect had op het percentage "bursting" kan veroorzaakt zijn door:

- (i) het reeds voldoende hoge B-gehalte van de planten waarvan het stuifmeel afkomstig is;
- (ii) de vrij hoge osmotische waarde van het medium;
- (iii) het grote aantal gebruikte stuifmeelkorrels, die volgens VISSER (1955) stoffen met borium-achtige werking zouden afscheiden.

### 5.3. KIEMING IN HOGE SUIKERCONCENTRATIES (zie tabellen 2 en 2a)

Het tellen van kiembuizen of pseudokiembuizen was hier vrij gemakkelijk. Om te zien of een vermoedelijke kiembuis een artefact was of duidelijk aan de stuifmeelkorrel vastzit, werd heel voorzichtig het dekglasje opgelicht waardoor de vloeistof in beweging kwam en eventuele artefacten losraakten van de stuifmeelkorrels.

In deze kiemingsmedia werd bij de klonen Hopi en Djarak een vermoedelijke kiembuis gevonden. Het gebruikte kiemingsmedium bij Hopi was een saccharoseoplossing van 35% waaraan 100 ppm  $H_3BO_3$  was toegevoegd in gedestilleerd water. Bij Djarak was een standaardoplossing gebruikt met 35% saccharose en 50 ppm  $H_3BO_3$  (zie foto 4). De groei van de vermoedelijke kiembuizen stagneerde echter vrij spoedig en kernen konden niet worden aangetoond. In dit verband wordt opgemerkt dat volgens VASIL (1960) bij Cucurbitaceae de lengte van stuifmeelbuizen op kunstmatige media korter bleef dan in vivo.

Verder werden ook enkele uitstulpingen met exine-wand gevonden, maar zonder kern.

Het percentage pseudokieming was hier vrij gering (3-14%). Evenals onder 5.2.1 werd er een negatieve correlatie gevonden tussen saccharose-gehalte en pseudokieming (tabel 2a). Het boorzuurgehalte had geen invloed op de hoeveelheid pseudokieming.

### 5.4. KIEMING OP AGAR (zie tabellen 3 en 3a, 4 en 4a)

Het microscopisch waarnemen van kieming of pseudokieming was hier vrij moeilijk door de artefacten aanwezig in de agar. Het percentage pseudokieming lag gemiddeld echter aanzienlijk hoger dan bij de vloeibare media, met name bij 0 en 10% saccharose. Ook het bepalen van de echtheid van een vermoedelijke kiembuis leverde problemen op.

Eén vermoedelijke kiembuis werd met zekerheid gevonden bij Djarak op een kiemingsmedium van agar met standaardoplossing waaraan 30% saccharose en 0 ppm boorzuur was toegevoegd. Ook in dit geval was de kiembuis kort.

Tabel 2. Gevonden percentages pseudokieming bij stuifmeel van drie batatecultivars in verschillende kiemingsmedia met (+) en zonder (-) standaardoplossing

Behandeling	Cultivars			DJARAK			HOPI			USA 130		
	1	2	gem.	1	2	gem.	1	2	gem.			
OB ; 35 S ; -	4,1%	3,8%	3,95%	6%	8,8%	7,4%	8,8%	5,9%	7,3			
OB ; 40 S ; -	1,8	2,7	2,25	3,1	3,8	3,45	8,9	9,9	9,4			
OB ; 45 S ; -	13	1,9	7,45	14,3	7,4	10,85	8,6	10,xx	9,3			
OB ; 50 S ; -	2,4	2,2	2,3	0	0	0	2,4	18,3	5,3			
OB ; 55 S ; -	7,6	3,8	5,7	5,9	6,1	6,0	7,5	2,5	5			
OB ; 60 S ; -	3,0	0,0	1,5	6,3	18,2	12,25	6,3	0,8	3,5			
50B ; 35 S ; -	7,1	2,5	4,8	0,8	4,3	2,55	14,7	11,5	13,1			
50B ; 40 S ; -	16,0	3,9	9,95	10,9	2,9	6,9	13,6	5,8	9,7			
50B ; 45 S ; -	3,7	1,0	2,35	1,0	0,9	0,95	8,8	16,7	12,2			
50B ; 50 S ; -	2,6	4,7	3,65	4,2	0,8	2,5	14,5	2,6	8,5			
50B ; 55 S ; -	1	1	1	0	4,5	2,25	19,1	4,4	11,7			
50B ; 60 S ; -	4,4	4,4	4,4	0*	0,9	0,45	4	2,4	3,2			
100B ; 35 S ; -	8,6	9,7	9,15	1	1,9	1,45	10,6	8,9,xx	9,7			
100B ; 40 S ; -	6,5	7	6,75	1	0	0,5	4,8	1,7	3,2			
100B ; 45 S ; -	11,2	6,3	8,75	2,9	0,7	1,8	3,8	3,7	3,7			
100B ; 50 S ; -	2,9	0,6	1,75	2,7	2,0	2,35	2,8	15,1	3,9			
100B ; 55 S ; -	4	1,6	2,8	1,6	3,4	2,5	0,9	4,5,xx	2,7			
100B ; 60 S ; -	0	0	0	0	1,0	0,5	2,5	0	1,2			
OB ; 35 S ; +	8,5	4,9	6,7	5,3	4,7	5,0	9,2	5	7,1			
OB ; 40 S ; +	12,2	20,4	16,3	2,7	4,3	3,5	1,5	0	0,7			
OB ; 45 S ; +	3,4	9	6,2	0	1,0	0,5	2,8	3,6	3,2			
OB ; 50 S ; +	2,3	4,1	3,2	5,2	2,6	3,9	1,5	2	1,7			
OB ; 55 S ; +	1,8	5,9	3,85	1,8	1,9	1,85	1,7	1	1,3			
OB ; 60 S ; +	4,5*	7*	5,75	1,4	3,0	2,2	5,9	1,9	3,9			
50B ; 35 S ; +	13,2*	11*	12,1	0,8	2,4	1,6	2,5	2,9	2,7			
50B ; 40 S ; +	12,9	15	13,95	6,7	0	3,35	6,4	7,9	7,1			
50B ; 45 S ; +	8,7	12,5	10,6	0	1,6	0,8	4,6	3	3,8			
50B ; 50 S ; +	7,6	4,9	6,25	2,5	4,1	3,3	6,1	4	5,0			
50B ; 55 S ; +	4	1,9	2,95	6,7	7,6	7,15	5,8	1,8	3,8			
50B ; 60 S ; +	1,7	0,9	1,3	6,4	5,8	6,1	5,2	0,9	3,0			
100B ; 35 S ; +	7,8	6,7	7,25	6,7	5,1	5,9	13	1,0	7,0			
100B ; 40 S ; +	10,5	10,2	10,35	2,6	8,3	5,45	10,7	0,9	5,8			
100B ; 45 S ; +	6,9	5,7	6,3	1,9	4,7	3,3	6,7	1,8	4,2			
100B ; 50 S ; +	9,2	4,7	6,95	0,8	6	3,4	9	2,9	5,9			
100B ; 55 S ; +	11,8	4,8	8,3	5	5,1	5,05	4,6	0,xx	2,3			
100B ; 60 S ; +	5,6	0,8	3,2	7,7	0,8	4,25	7,6	0,9	4,2			

\* ) = een of enkele korrels met vermoedelijke kiembuis;

\*\* ) = een of enkele korrels "pseudokieming met exinewand".

Tabel 2a. Gemiddelde percentages pseudokieming bij stuifmeel van de in tabel 2 genoemde klonen gerangschikt naar toenemend suikergehalte (+) = met basisoplossing; (-) = zonder basisoplossing

Cultivar		DJARAK	HOPI	USA 130	Gemiddeld
Saccharose%					
35	+	5,97	3,80	10,07	6,61
	-	8,68	4,17	5,60	6,15
	gem.	7,33	3,99	7,84	6,38
40	+	6,32	3,62	7,45	5,80
	-	13,53	4,10	4,57	7,40
	gem.	9,93	3,86	6,01	6,60
45	+	6,18	4,53	8,43	6,38
	-	7,70	1,53	3,75	4,33
	gem.	6,94	3,03	6,09	5,36
50	+	2,57	1,62	5,95	3,88
	-	5,47	3,53	4,25	4,42
	gem.	4,02	2,58	5,10	3,90
55	+	3,17	3,58	6,48	4,41
	-	5,03	4,68	2,48	4,06
	gem.	4,10	4,13	4,48	4,24
60	+	1,97	4,40	2,67	3,01
	-	3,42	4,18	3,73	3,78
	gem.	2,70	4,29	3,20	3,40



Tabel 3a. Gemiddelde percentages pseudokieming bij stuifmeel van de in tabel 3 genoemde klonen gerangschikt naar toenemend suikergehalte

Cultivar Saccharose %	DJARAK	HOPI	USA 130	Gemiddeld
0	13,12	26,60	23,42	21,05
10	9,82	11,56	13,28	8,22
20	3,18	1,00	2,96	2,38
30	2,63	3,22	0,46	2,10

Tabel 4. Gevonden percentages pseudokieming bij stuifmeel van drie batatecultivars in verschillende kiemingsmedia op agar met hoge suikerconcentraties. Alle behandelingen met standaardoplossing  
B = boorzuur (ppm ); S = saccharose (%)

Cultivar	Kiemings- medium	OB	OB	OB	50B	50B	50B	100B	100B	100B
		35S	40S	45S	35S	40S	45S	35S	40S	45S
DJARAK	1	15,13	1,00	0	5,56*	0**	0	2,00	0	0
	2	1,00	1,00	0**	2,00	1,00	0	4,00	2,00	0
	gem.	8,07	1,00	0	3,78	0,50	0	3,00	1,00	0
HOPI	1	0**	0	1,00	1,00*	0	1,00	0**	0	1,00
	2	1,32	0	1,00	5,00	0	1,00	4,00	1,00	0
	gem.	0,66	0	1,00	3,00	0	1,00	2,00	0,50	0,50
USA 130	1	10,28*	1	0	2,00	1,00	0	3,00	1,00	0
	2	1,00	-	2,00	3,00	3,00	2,00	1,00	1,00	0
	gem.	5,64	1	1,00	2,50	2,00	1,00	2,00	1,00	0

\* = een of enkele korrels met vermoedelijke kiembuis.  
\*\* = een of enkele korrels "pseudokieming met exinewand"

Tabel 4a. Gemiddelde percentages pseudokieming bij stuifmeel van de in tabel 4 genoemde klonen gerangschikt naar toenemend suikergehalte

Cultivars Saccharose %	DJARAK	HOPI	USA 130	Gemiddeld
35	4,95	1,89	3,38	3,47
40	0,83	0,17	1,33	0,78
45	0	0,83	0,67	0,50

Tabel 5. Gevonden percentages pseudokieming bij stuifmeel van drie batatecultivars in verschillende kiemingsmedia met stempelextract (2mg/ml) .S = saccharose (%)

Cultivar	Kiemingsmedium	Saccharose (%)						
		0S	10S	20S	30S	35S	40S	45S
DJARAK (stempelextract: BROKOPONDO)	1	10,00	3,00	0	1,00	5,00	1,00	7,00
	2	6,00	3,00	1,00	2,00	0	2,00	0
	gem.	8,00	3,00	0,50	1,50	2,50	1,50	3,50
HOPI (stempelextract: BROKOPONDO)	1	17,31	12,59	6,78	7,19	17,48	4,00	2,00
	2	4,00	2,00	4,00	5,00	3,00	1,00	7,00
	gem.	10,66	7,25	8,49	6,10	10,24	2,50	4,50
USA 130 (stempelextract: CENTENNIAL)	1	15,50	5,00	2,50	3,50	2,38	0,50	2,80
	2	13,50	9,00	2,74	0,50	3,36	1,50	2,50
	gem.	14,50	7,00	2,62	2,00	2,87	1,00	2,65
TOTAAL GEMIDDELD		11,05	5,75	3,87	3,20	5,20	1,57	3,55

Ook bij "USA 130" werd een vermoedelijke kiembuis gevonden op een kiemingsmedium van agar met standaardoplossing waaraan 35% saccharose toegevoegd (zie foto 5).

Op agar werd zelden sliertvormige pseudokieming gezien, terwijl "bursting", een vormloze massa cytoplasma rondom de stuifmeelkorrel, algemeen was.

Pseudokieming verminderde met toenemend suikergehalte ook bij de zeer hoge suikerconcentraties (35, 40, 45% saccharose); zie tabellen 4 en 4a. Het percentage-korrels met pseudokieming was bij deze hoge suikerconcentratie doorgaans laag en varieerde van 0 tot 15%.

#### 5.5. KIEMING IN STEMPELEXTRACT (zie tabel 5)

Hoewel het gebruikte stampelextract steeds afkomstig was van goed compatibele klonen werd in geen enkel geval kieming gevonden. Pseudokieming trad ook hier vaak op, hoewel het aantal nergens de 20% overschreed.

Het niet voorkomen van kieming bij gebruik van compatibele stuifmeel-stampelextract combinaties doet twijfel rijzen aan de hypothese van FUJISE (1964) dat door de uitschakeling van remstoffen uit de stempel door een neutraliserende stuifmeelsubstantie stimulering van de kieming kan plaatsvinden. De mogelijkheid bestaat echter dat de betreffende stoffen (of één ervan) door het overbrengen in een onnatuurlijk medium onwerkzaam zijn geworden.

#### 5.6. DISCUSSIE

De negatieve correlatie tussen saccharosegehalte en pseudokieming geeft steun aan de veronderstelling dat saccharose een osmotische functie heeft. Ook het voorkomen van enkele vermoedelijke kiembuizen bij betrekkelijk hoge saccharosegehalten wijst hierop. Het feit echter dat vermoedelijke kieming ook op agarmedia alleen bij een hoog suikergehalte plaatsvindt zou ervoor pleiten dat suiker ook een voedende functie heeft. Agar neemt immers hier door zijn colloïdale aard de plaats van suiker als osmotische factor (ten dele) over. Dit zou dan in overeenstemming zijn met de hypothese dat trinucleaat stuifmeel onvoldoende stofwisselingsprodukten bezit tijdens het vrijkomen en dus voedingsstoffen van buitenaf (hier saccharose) nodig heeft.

Pseudokieming kan een gemodificeerde of onregelmatige kiemingsreactie zijn, het meest waarschijnlijk in gevallen waarin een intacte exine-wand en een kern in de "buis" zichtbaar waren. In het algemeen zal dit echter niet zo zijn, daar de vermoedelijke kiembuizen gevonden werden waar het % pseudokieming juist gering was, dat is bij hoge suikerconcentraties.

Borium toonde geen duidelijk effect, wat overeen zou kunnen komen met de theorie dat veel pollenkorrels bij elkaar hetzelfde effect hebben als borium, doordat ze een stimulerende stof afscheiden. Meer inzicht hierover zou zijn te verkrijgen door kieming van stuifmeel in verschillende "dichtheden" te bestuderen.

Volgens KATO (1955) en CHADLER (1957) (in VASIL, (1966)) heeft gibberelline invloed op de kieming van stuifmeel van sommige planten, in die zin dat de kiembuizen langer worden. Door media samen te stellen met hoge suikerconcentraties en gibberelline zou misschien een verlenging van de "vermoedelijke kiembuizen" in vitro bewerkt kunnen worden, waardoor de kiembuisnatuur van de uitstulpingen meer waarschijnlijk zou worden.

De invloed van de temperatuur is in het beschreven onderzoek nauwelijks nagegaan. De meeste behandelingen hadden plaats bij een temperatuur van ca. 24°C. Alleen in het door mevr. Ir. C. Douwes-Wagenaar uitgevoerde vooronderzoek werd ook de kieming bij wat hogere temperatuur bekeken (zie ANONYMUS, 1970). VASIL et al. (1959) meenden dat de temperatuur effect heeft op de stuifmeelgroei.

## 6. LITERATUUR

- ALLARD, R.W., 1960. Principles of Plant Breeding. Int. Student Ed., Toppan Printing Company, Ltd. (Japan). pp. 238 - 243.
- ANONYMUS, 1969. Onderzoek naar de vruchtzetting bij de bataat, *Ipomoea batatas* Poir. CELOS kwartaalverslagen 12: 46 - 48.
- ANONYMUS, 1970. Onderzoek naar de vruchtzetting bij de bataat, *Ipomoea batatas* Poir. CELOS kwartaalverslagen 13: 42 - 44.
- ANONYMUS, 1970. Onderzoek naar de vruchtzetting bij de bataat, *Ipomoea batatas* Poir. CELOS kwartaalverslagen 14: 41 - 42.
- ANONYMUS, 1970. Onderzoek naar de vruchtzetting bij de bataat, *Ipomoea batatas* Poir. CELOS kwartaalverslagen 15: 43 - 44.
- BREWBAKER, J.L. 1957. Pollen cytology and self-incompatibility systems in plants. J. Hered., 48: 271 - 277.
- BREWBAKER, J.L. & S.K. MAJUMDER, 1959. Incompatibility and the pollengrain. Recent Adv. in Bot., 1: 1503 - 1508.
- BREWBAKER, J.L. & B.H. KWACK, 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot., 50: 859 - 865.
- COBLEY, L.S., 1905. An introduction to the botany of tropical crops. Longmans, Green and Co., Ltd. London etc. pp. 170 - 175.



- JONES, A., 1965. Cytological observations and fertility measurements of sweet potato, *Ipomoea batatas* (L) Lam. Proc. Am. Soc. hort. Sci., 86: 527 - 537.
- O' KELLEY, J.C., 1955. External carbohydrates in growth and respiration of pollen tubes in vitro. Am. J. Bot., 42: 322 - 326.
- O' KELLEY, J.C., 1957. Boron effects on growth, oxygen-uptake and sugar absorption by germinating pollen. Am. J. Bot., 44: 239 - 244.
- MARTIN, F.W. & SONIA ORTIZ, 1966. Germination of sweet potato pollen in relation to incompatibility and sterility. Proc. Am. Soc. hort. Sci., 88: 491 - 497.
- MARTIN, F.W. & E. CABANILLAS, 1966. Post-pollen germination barriers to seed set in sweet potato. Euphytica, 15: 404 - 411.
- MARTIN, F.W., 1967. The sterility-incompatibility complex of the sweet potato. Proc. int. Symp. trop. Root Crops, St. Augustine, Trinidad, 2-8 April, 1967, Vol. 1, Sect. 1: 3 - 15.
- PURSEGLOVE, J.W., 1968. Tropical Crops, Dicotyledons Vol. 1, Longmans, Green and Co., Ltd., London etc.. pp. 78 - 88.
- PANDEY, K.K., 1959. Evolution of gametophytic and sporophytic systems of self-incompatibility in Angiosperms. Evolution, 14: 98 - 115.
- SCHMUCKER, Th., 1935. Über den einfluss von Borsäure auf Pflanzen, insbesondere keimender Pollenkörner. Planta, 23: 264 - 289.
- SCHREVEN, A.C. van, 1953. Investigations on the flower-biology and compatibility of the sweet potato, *Ipomoea batatas* Poir, including some trials on the germination of the seed. Landbouw, (Buitenz.), 25: 305 - 346.
- SPURR, A.R., 1957. The effects of Boron in cellwallstructure in celery. Am. J. Bot., 44: 637 - 650.
- TING, Y.C. & A.E. KEHR, 1953. Meiotic studies in the sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). J. Hered., 44: 207 - 211.
- TSUNG CHEN HUANG, 1948. Chemical stimulation in pollen-germination and pollen tube growth. Bot. Bull. Ac. Sinica, Vol. 2: 282 - 294.
- TUPY, J., 1960. Sugar absorption, callose formation and the growth rate of pollen-tubes. Biol. Plant. (Prague), 2: 169 - 180.
- VASIL, I.K. & N. BOSE, 1959. Cultivation of excised anthers and pollen-grains. Ind. Bot. Soc. Mem., 2: 11 - 15.
- VASIL, I.K., 1960. Studies on pollen germination of certain Cucurbitaceae. Am. J. Bot., 47: 239 - 247.

- VISSER, I., 1955. Germination and storage of pollen, Proefschrift, Landb. hogesch. Wageningen. pp. 2 - 46.
- WILLIAMS, D.B. & F.W. COPE, 1967. Notes on self-incompatibility in the genus *Ipomoea* L.. Proc. int. Symp. trop. Root Crops, St. Augustine, Trinidad, 2-8 April, 1967, Vol. 1 : 16 - 30.