Bibliotheek
Proefstation
Naaldwijk
A
05
R
22

EFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS

NAALDWIJK.

Oriënterende proefjes betreffende de stuifmeelkieming in vivo en in vitro, 1964 - 1965

door:

W.van Ravestijn

Naaldwijk,1966.

2227476

A
05
R
22

057291: 54
Standbook no. 807

PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder Glas te Naaldwijk
Bibliotheek

Oriënterende proefjes betreffende de stuifmeelkieming van paprika in vivo en in vitro 1964 - 1965-

Inleiding

Naar het zich laat aanzien, kan in de toekomst de tomaat, vooral vroeg in het jaar, goeddeels door de paprika verdrongen worden. Om iets meer van de stuifmeelkieming en hechting van dit gewas te weten te komen, werd oriënterend nagegaan, welke werkwijzen hiervoor geschikt zijn. In eerste instantie werd dus naar bruikbare methoden gezocht, om de kieming in vivo en vitro te bepalen.

Werkwijzen

Voor de kieming in vivo werd het recept van L.A. Dionne en P.C. Spicer als richtlijn gebruikt (Stain Technology 1958 No. 33 blz. 15-17). Op 1 september 1964 werden ± 60 bloemen geëmasculeerd ('s middags). De stempels werden op 3 september 's-middags bestoven en ± 2 - 3 uur na de bestuiving gefixeerd. De fixatie vond plaats in een mengsel van 3 delen alcohol 96 en één deel ijsazijn. De stijlen bleven 1 uur bij kamertemperatuur in deze oplossing staan, waarna het geheel in de ijskast werd gezet. Op 4 september werden de stijlen in drie groepen verdeeld. Elke groep werd apart gehydrolyseerd. De volgende tijden werden hierbij aangehouden; 20, 30 en 40 minuten. De hydrolysatie vond steeds bij 60°C in 45% azijnzuur plaats. Na het hydrolyseren werden de stijlen gekleurd in een mengsel van 150 mg safranine en 25 mg alineblauw opgelost in zeer warme 45%-ige azijnzuur (met terug vloeikoeler). Voor het kleuren werd de afgekoelde kleurstof steeds gefiltreerd. Na het kleuren werden de stijlen òf in de kleurstof òf in de glycerine-gelatine geplet en bekeken.

de duur van het kleuren werd gevarieerd. Bij 20 minuten hydrolyseren werd er gedurende 5, 10 en 15 minuten gekleurd, bij 30 minuten hydrolyseren 10, 15, 20 en 25 minuten, omdat toen reeds bleek, dat 5 minuten kleuren aan de korte kant was. Bij 40 minuten hydrolyseren werden kleurtijden van 15, 20 en 25 minuten aangehouden. Hieronder volgen in het kort de gevonden resultaten.

Resultaten

Hydrolyseren gedurende 20 minuten

De stijlen waren iets doorzichtig en goed pletbaar. Aangezien de stijlen van de paprika vrij dik zijn (t.o.v. tomaat) werd met een vrij lange hydrolyseertijd begonnen. Verwacht werd, dat deze stijlen moeilijk pletbaar (zacht te maken) zouden zijn. Dit bleek dus erg mee te vallen. De dikte van de stijlen had wel tot gevolg, dat slechts 1 stijl per dekglas kon worden gebruikt. De stempels drukten namelijk zo breed uit, dat het gehele dekglas goeddeels gevuld was. Ook moest bij de paprika de gehele stijl worden geplet, omdat de stempelpunt en de aanhechtingsplaats naar het vruchtbeginsel hier met het blote oog niet van elkaar te onderscheiden zijn. Dit dus in tegenstelling met de tomaat en ook één van de redenen, waarom maar 1 stempel per dekglas gebruikt kon worden.

Kleuren gedurende 5 minuten

1. Preparaat in kleurstof
2. Preparaat in glycerine-gelatine (gg)

} De stuifmeelkorrels waren blauw met een blauwe kiembuis. Soms waren de korrels doorzichtig met licht blauwe buis. De meeste korrels waren duidelijk geschrompeld. Ook de geschrompelde korrels waren blauw. De kleuring voldeed in beide gevallen matig tot redelijk.

Kleuren gedurende 10 minuten

1. Preparaat in kleurstof.
   Dit preparaat voldeed goed. Ook hierbij waren de geschrompelde korrels blauw, maar dit was wel zo eenvoudig voor een duidelijk onderscheid als rood doorzichtige korrels. Soms lag de gehele inhoud van de korrel met kiembuis en al naast de korrel. Of dit van nature ook so is (zoals bij

de druif mogelijk is) of dit door te hard pletten is gekomen, blijft nog een open vraag.

2. Preparaat in gg.

Ook dit preparaat voldoed goed maar leek wel iets minder contrastrijk dan het preparaat in kleurstof. Vooral de geschrompelden leken lichter van kleur.

Kleuren gedurende 15 minuten

Zowel het preparaat in kleurstof als in gg was goed bruikbaar. Weinig tot geen verschil tussen de beide preparaten.

Hydrolyseren gedurende 30 minuten

Kleuren gedurende 10 minuten

Beide preparaten (kleurstof en gg) voldeden goed. Bij het preparaat in kleurstof leek het verschil tussen wel en niet gekiemd iets duidelijker dan bij gg.

Kleuren gedurende 15 minuten

Beide preparaten voldeden weer goed. Bij deze langere kleurtijd is het verschil tussen „kleurstof" en „gg" niet noemenswaard. Toevallig zaten er echter op de stempels in gg meer korrels, waardoor deze preparaten gemakkelijker iets gunstiger werden beoordeeld. De kiembuizen laten gemakkelijk de geschrompelde pollen los. Bij tellingen dus alleen de pollen tellen. Lege korrels dan als gekiemd beschouwen en deze gebruiken bij de beoordeling van de kiemsnelheid.

Kleuren gedurende 20 minuten

Beide preparaten waren weer goed bruikbaar. Waren de „lege" pollen in gg iets beter te zien dan in gg maar was het totale contrast wellicht minder ?

Kleuren gedurende 25 minuten

Beide preparaten voldeden goed.

Hydrolyseren gedurende 40 minuten

Kleuren gedurende 15 minuten.

Beide preparaten voldeden goed maar de kleuring kon intensiever. De langere hydrolysatie scheen de kleuring dus te verflauwen.

Kleuren gedurende 20 minuten

Beide preparaten voldeden goed.

Kleuren gedurende 25 minuten

Beide preparaten voldeden goed. Uit bovenstaande blijkt, dat de stuifmeelkieming op de stempel door middel van deze kleuring heel goed zichtbaar te maken is. De tijd van hydrolyseren kan op 20 minuten worden gehouden. De aldus behandelde stempels waren immers goed uitdrukbaar en kleurden intensiever dan bij langere hydrolysatie het geval is.
De tijd van de kleuring zal juist ook in verband met de vrij korte hydrolysatie-duur op ± 15 minuten kunnen worden gehouden. Of de preparaten in kleurstof of in gg moeten worden gemaakt komt minder duidelijk tot uiting. In kleurstof schijnen de resultaten af en toe beter te zijn dan in gg. GG. heeft echter het grote voordeel, dat de preparaten niet uitdrogen en dus niet omrand behoeven te worden. In kleurstof moet dit wel gebeuren, vooral als in de toekomst van de gemaakte preparaten foto's moeten worden genomen. Omranden ging goed met warme gg, paraffine-olie en vaseline. Bij paraffine-olie trok de kleurstof in het centrum van het dekglas samen en was daarom dus minder geschikt. Vaseline moest evenals gg warm worden gemaakt. Gg. wordt echter bij afkoeling vrij stevig van substantie, vaseline blijft altijd „troep".

Voorlopig werd dus de helft van de stijlen in kleurstof bekeken en de andere helft in gg.

Invloed uitplanten op een voedingsbodem

Bij veel kiemingsproeven is het belangrijk de omstandigheden volkomen in de hand te hebben en de invloed van de plant uit te schakelen. Daarom is het werken met alleen de bloemen, die op een voedingsbodem staan uitgeplant, een geschikte methode. Om nu na te gaan, in hoeverre deze methode

de kiesing beïnvloedt, werden op 16/9 van 14 tot 15 uur 20 bloemen aan de plant geëastreerd en 20 losse bloemen van hun meeldraden ontdaan, waarna deze op een voedingsbodem (zie bijlage 1) werden uitgeplant. De bloemen op de bodem werden bij hoge luchtvochtigheid en kamertemperatuur „bewaard" tot de bestuiving. De bestuiving vond de volgende dag plaats. De bloemen op de voedingsbodem werden toen in de kas bij de overige geëastreerde bloemen gezet. Er werd 2 en 5 uur na de bestuiving gefixeerd. Bij het maken van de preparaten werd de helft van de stempels in kleurstof en de andere helft in gg bekeken. De verkregen uitkomsten geeft onderstaande tabel.

Invloed plant-bodem

	Aantal gekiemd		totaal	aantal stijlen	Hechting (5)	Kiemingspercentage (6)	Snelheid (7)
	rood	blauw					
Na 2 uur							
Plant	40	285	337	10	34	84,7	14,0
Bodem	19	353	405	9	41	87,2	5,4
Na 5 uur							
Plant	494	971	1168	10	117	83,1	50,9
Bodem	540	1090	1200	10	120	90,8	49,5

Hieruit blijkt dus, dat de kieming (is kiemingspercentage zie kolom 6) niet benadeeld werd door het planten van de bloemen op de voedingsbodem, maar integendeel juist iets eerder werd verbeterd. Mogelijk werd dit veroorzaakt door het feit, dat deze bloemen goed turgescent bleven. Ook de hechting (kolom 5) werd òf iets verbeterd òf niet of nauwelijks beïnvloed. Dit is bij tomaat ook vrijwel altijd het geval en wordt vermoedelijk veroorzaakt door de stand van de bloemen. Hierdoor kan zelfs als de kleefkracht niet optimaal is het stuifmeel toch gemakkelijk op de stempel blijven liggen, omdat de stempels naar boven gericht staan.

De kiemsnelheid (percentage „leeg" t.o.v. gekiemd, kolom 7) leek aanvankelijk bij de bloemen op de bodem duidelijk minder te zijn dan bij de bloemen aan de plant. De latere controle (5 uur na de bestuiving) gaf een volkomen verwaarloosbaar verschil aangaande de kiemsnelheid tussen de „bodem" en „plant" bloemen te zien. Aangezien de kiemsnelheid 2 uur na de bestuiving bepaald meestal gering is, wordt gewoonlijk alleen de bepaling van 5 uur na de bestuiving gebruikt. Uit dit oogpunt bekeken is de kiemsnelheid van 2 uur van ondergeschikt belang. Samenvattend kan

men dus zeggen, dat deze methode van stuifmeelonderzoek betrouwbaar genoemd kan worden. In deze proef werd tevens de helft van de stijlen in kleurstof en de andere helft in gg bekeken. Juist nu met volkomen gelijke behandelingen werd gewerkt, kwam toch wel naar voren, dat de preparaten in kleurstof beter te tellen waren. In bijlage 2 is dit fotografisch in beeld gebracht. Duidelijk is de intensievere kleuring van de pollen en pollenbuizen in de kleurstof te zien.

Stuifmeelbezetting van scherpe pepers. -januari 1965 -

Bij een zeer vroege teelt, waarbij de bloei in januari 1965 begon, vond bloemrui plaats. Ook bloemen, die niet afvielen gaven toch geen vruchtvorming te zien. Bij enkele buiten de proef planten van dit gewas werd nagegaan, hoe het met de stuifmeelbezetting op de stempel gesteld was en werd tevens nagegaan, of door kunstmatige bestuiving de bezetting verbeterd kon worden. De bestuiving werd uitgevoerd, door met een penseeltje voorzichtig in het bloempje te „rommelen", waardoor getracht werd het stuifmeel op het stempeltje te brengen. De stuifmeel vorming was prima. Er werd steeds vrij stuifmeel in en op de bloeiende bloempjes gevonden.

Het eerste proefje vond op $^{15}/_{1}$ plaats. Bestoven werd er om ± 11 uur (temperatuur 22,5°C luchtvochtigheid 56%) met zonnig weer en iets nevel. Gefixeerd werd er om ± 13 uur. De lucht was toen bewolkt (temperatuur 2 ,5°C luchtvochtigheid 49%). De stempels werden iets korter gehydrolyseerd dan bij paprika, omdat deze stijlen fijner waren dan die van de paprika.

Bij de tellingen bleek, dat bij de 10 voorbestoven bloemen maar op één stempel iets stuifmeel werd gevonden (4 korrels). Bij de bestoven bloemen werd bij 7 van de 10 stempels iets stuifmeel gevonden. Het aantal korrels per stempel was ook hierbij verschrikkelijk laag (aantal korrels 1 - 2 - 5 - 5 - 5 - 7 - 10). Wel waren de korrels vrijwel allemaal gekiemd. Het leek er dus op, dat de hechting de boosdoener was, want stuifmeel was er genoeg en ook de kiemkracht was goed als het stuifmeel maar wilde hechten. Om de hechting te verbeteren werd gedacht aan het verhogen van de luchtvochtigheid. Daarom werd op 20/1 om ± 8.30 uur enkele planten gebroesd. Om ± 11.30 uur van dezelfde dag werd een gedeelte van de bloemen weer bestoven. Het weer was toen zonnig. De temperatuur in de kas bedroeg 22,1°C en ondanks het broesen was de luchtvochtigheid slechts 43%-. In de proefruimte werd CO_2 gegeven door propaan te verbranden. Dit was zowel om 11.30 uur bij het bestuiven als om 13.30 uur bij het fixeren het geval. Gedurende de

fixatie scheen de zon. De temperatuur was toen 21,8°C en de luchtvochtigheid bedroeg 47%. De invloed van het broezen was dus t.a.v. de luchtvochtigheid volstrekt onvoldoende geweest, wat ook niet zo verwonderlijk is, als men bedenkt dat maar enkele planten in de gehele kweekruimte werden gebroesd. Het enige effect van het broezen zou dus in een verbeterde turgescentie, vooral van de stempelpapillen, kunnen worden toegeschreven samengaande met het nog enigszins nat zijn van de stempels door direkt contact met het broeswater. Het aantal korrels dat na kleuring op de stempels werd gevonden was als volgt.

	aantal stijlen zonder korrels	aantal korrels op de overige stijlen
Niet broezen, niet bestuiven	9	3
niet broezen, bestuiven	6	1 - 1 - 1 - 1
broezen, niet bestuiven	6	3 - 25 - 3 - 1
broezen, bestuiven	7	5 - 2 - 3.

De bevruchting was nog steeds bijzonder slecht. Zowel broezen als bestuiven gaven een geringere verbetering van de stuifmeelbevruchting te zien, maar beide onvoldoende om een goede vruchtzetting te geven. Toch leek broezen nog iets meer invloed uit te oefenen dan bestuiven. Gezien de reeds eerder genoemde onvolkomenheden bij het broezen, geeft dit toch wel een aanwijzing in de richting van verhoging van de luchtvochtigheid. Ook is het verwonderlijk dat de toediening van CO_2 niet in een hogere luchtvochtigheid resulteerde.

De kieming in vitro

Behalve de kieming in vivo werd ook naar een methode gezocht om de kieming in vitro te bepalen. De 1e oriënterende proef werd op 2 september 1964 ingezet. Vergeleken werden vier suikerconcentraties (10, 15, 20 en 25%), die elk met 2 H_3BO_3-concentraties (0 - 0,001 en 0,01%) werden gecombineerd. De kieming vond plaats in Tieghemcellen bij 25 C in het donker.

De gevonden resultaten geeft onderstaande tabel.

	1	2	3	4	5	6	totaal	Opmerkingen
	kiemingspercentages							
10% suiker	0	0	1	1	1	2	5	korte buisen
15% suiker	2	1	0	0	0	2	5	korte buisen
20% suiker	0	0	1	0	0	1	2	korte buisen
25% suiker	0	0	0	0	0	0	0	
10% suiker + 0,001% H_3BO_3	2	0	0	0	1	3	6	korte buisen
15% suiker + 0,001% H_3BO_3	1	0	0	1	0	0	2	korte buisen
20% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
25% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
10% suiker + 0,01% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
15% suiker+ 0,01% H_3BO_3	0	1	0	0	1	0	2	korte buisen
20% suiker + 0,01% H_3BO_3	0	0	0	0	0	1	1	korte buisen
25% suiker + 0,01% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	

Een suikerconcentratie van 10% gaf nog de beste resultaten. De invloed van B was niet erg duidelijk. Bij een 2° proefje werden lagere suikerconcentraties genomen (5, 7½, 10 en 12½%) gecombineerd met 0 - 0, 001% en 0005% H_3BO_3.
De gevonden kiemingspercentages waren als volgt .

	1	2	3	4	5	6	totaal	Opmerkingen
	kiemingspercentages							
5% suiker	0	1	1	0	2	0	4	korte buisen
7,5% suiker	0	0	0	0	0	1	1	korte buisen
10% suiker	0	1	0	1	0	0	2	korte buisen
12,5% suiker	0	0	0	0	0	0	0	
5% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
7,5% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
10% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	0	0	1	0	0	1	korte buisen
12,5% suiker + 0,001% H_3BO_3	0	2	2	0	0	0	4	korte buisen
5% suiker + 0,005% H_3BO_3	0	verdr.	0	0	verdr.	0	0	
7,5% suiker + 0,005% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
10% suiker + 0,005% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	
12,5% suiker + 0,005% H_3BO_3	0	0	0	0	0	0	0	

De nu verkregen kiemingspercentages waren zo mogelijk nog lager

dan bij de 1e proef. Het paprika-stuifmeel schijnt in vitro niet gemakkelijk te kiemen, althans niet bij de hier gevolgde kiemingsmethode. Het stuifmeel self was niet dood en bevat eenredelijke kieming in vivo. Dit blijkt uit de gegevens van het „voedingsbodemproefje", waarbij men 60% kieming kreeg. Het stuifmeel voor deze kiemingsproefjes in vitro waren van dezelfde planten afkomstig en werd in vrijwel dezelfde tijd verzameld.

Samenvatting en conclusies

Uit deze oriënterende proefjes kwam het volgende naar voren :

1. De kieming in vivo is met een aangepast kleuringsschema van L.A. Dionne en P.C. Spicer goed na te gaan.

2. De uitvoering van de kleuring is als volgt :
   Fixeren : 1 uur in 3 delen alcohol 96 en 1 deel ijsazijn bij kamertemperatuur.
   Hydrolyseren : 20 minuten in 45% azijnzuur van 60°C.
   Kleuren : 15 minuten in de standaard kleurstof, die ook voor de tomaat gebruikt wordt.
   Platten en bekijken : in de kleurstof, de dekglaasjes met glycerine-gelantine omranden.
   Aantal stempels per dekglas : 1, de gehele stijl met stempel uitdrukken.

3. De kieming op de stempel bij bloemen, die op een kunstmatige voedingsbodem staan uitgeplant, goe plaat kan vinden. De hechting en kieming zijn volkomen vergelijkbaar met bloemen „aan de plant". De kiemsnelheid na 2 uur bepaald ligt waarschijnlijk lager dan bij „ aan de plant".

4. Bij scherpe pepers bloemrui en onvoldoende vruchtzetting, kan voorkomen, ondanks het feit dat er voldoende wordt gevormd en loskomt en dit stuifmeel goed kiemt. De oorzaak zal dan waarschijnlijk aan een onvoldoende stuifmeelhechting kunnen worden toegeschreven, die zijn voorsprong mogelijk in een te droge lucht vindt.

5. Kieming in vitro met de hier gebezigde methoden niet kon worden bepaald.

De proefnemster,

Proefstation Naaldwijk,
maart 1966
MM.

W. van Ravestijn

Samenstelling van de voedingsbodem

I.	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	500 mg/l
	KNO_3	125 mg/l
	$Mg\ SO_4 \cdot 7\ H_2O$	125 mg/l
	$KH_2\ PO_4$	125 mg/l

II. Per liter van bovengenoemde oplossing 1 ml van de volgende sporenelementen-oplossing.

H_2SO	s.g. 1,83	0,5 ml/l
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$		3000 mg/l
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$		500 mg/l
$H_3\ BO_3$		500 mg/l
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$		25 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$		25 mg/l

III. IJzer in de vorm van Fedta (10% Fe) 30 mg/l
Dit is 3 mg Fe^{+++} per liter.

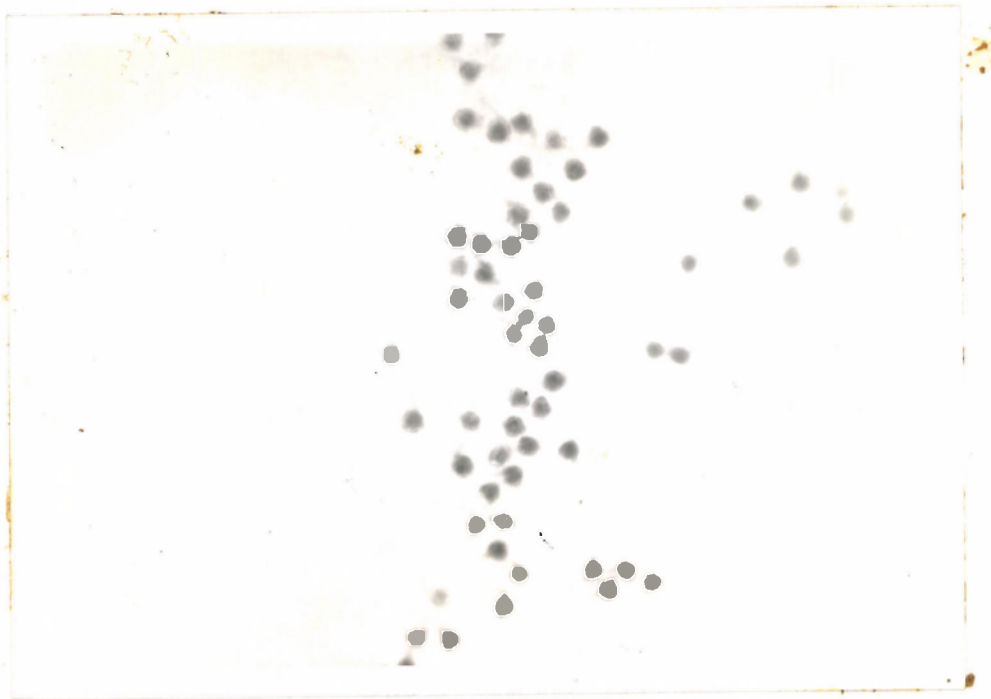
IV. Thianine (aneunine - hydrochloride, vit.B_1) 1 mg/l.

V. L.cysteïne - hydrochloride (een amino-zuur) 10 mg/l.

VI. Saccharose 50 g/l.

VII. Noble-agar 15 g/l.
pH ± 4.
Steriliseren gedurende 15 minuten bij 1 atm.

Stempels 2 uur na de bestuiving.

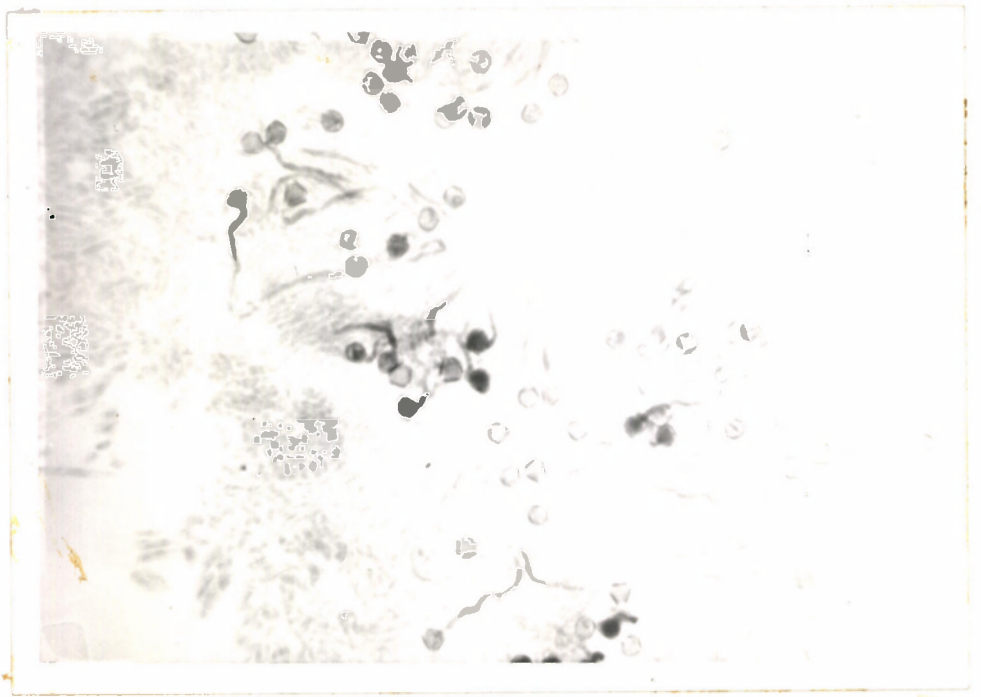


in glycerine - gelatine



in kleurstof

Stempel 5 uur na de bestuiving.



in kleurstof.