

cb

Bibliotheek  
Proefstation  
Naaldwijk

A

05

R

22

STATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS,

TE NAALDWIJK.

Stuifmeelkieming van leeuwenbekken 1961.

door:

W. van Ravestijn

Naaldwijk, 1962.

2228139

STUIFMEELKIEMING VAN LEEUWEBEKKEN 1961.

Project II-38.

Inleiding.

Gezien de slechte zetting van de leeuwebekken, waarvan zaad gewonnen moest worden, is nagegaan, in hoeverre het stuifmeel in vivo en vitro kient. Bovendien werd de invloed van bestuiving nagegaan, want wellicht werd de slechte zetting door een onvoldoende bestuiving veroorzaakt.

Methodiek.

Allereerst werd er <sup>naar</sup> een methode gezocht, hoe de stempels moesten worden behandeld, om de gekiemde en niet gekiemde stuifmeelkorrels op de stempel zichtbaar te maken. Als leidraad werd het recept van L.A. Dionne en P.C. Spicer genomen (zie bijlage 1).

Op 28 april te 11.30 u. werden enkele bloemen zelfbestoven. Het waren alle witte leeuwebekken, die buiten de proef stonden. Om 14.30 u. werden de stijlen gefixeerd (dus 3 u. na de zelfbestuiving) in 3 dl. alc. 96% en 1 dl. ijsazijn gedurende 1 uur. Om 15.30 u. werden de stijlen in de fixeervloeistof in de ijskast geplaatst. De temperatuur lag even boven het vriespunt, maar door een misverstand is de temperatuur tot onder nul gedaald. Op 1 mei werden de stijlen gehydrolyseerd in 45% azijnzuur bij 60°C. Vergeleken werd 20, 30 en 40 min. hydrolyseren. De beste hydrolysatie-duur bleek 20 min. te zijn.

De gehydrolyseerde stijlen werden 3, 6 of 10 min. gekleurd. 3 Minuten kleuren bleek te kort te zijn. Niet gekiemde korrels bleken hierbij soms rood te zijn, evenals de gekiemde korrels en het onderliggende weefsel. Bij een kleuringsduur van 6 en 10 minuten voldeed de kleuring bij de stijlen, die 20 min. waren gehydrolyseerd, goed (bijlage 2 + 2a). De stempels werden in glycerine-gelatine bekeken.

### Kieming in vivo en vitro.

Op 9 mei 1961 werden 40 bloemen gecastreerd, door de meeldraden en bloembekleedselen te verwijderen. Dit laatste, het verwijderen van de bloembekleedselen was m.i. niet nodig en kon wellicht de kieming ongunstig beïnvloeden. Op 12 mei tussen 8.35 en 8.40 u. werden alle stempels beïnvloeden met stuifmeel van hetzelfde ras. Het fixeren van de stijlen vond 2, 4, 8 en 24 uur na de bestuiving plaats. Dit was dus om resp. 10.35 (2 u), 12.35 (4 u), 16.35 (8 u) en 13 mei om 8.35 u (24 u). Eén uur na de fixatie werden de stijlen in de fixatie-vloeistof naar de ijskast overgebracht. Op 15 mei werden de stijlen 20 min. in 45% azijnzuur bij 60°C gehydrolyseerd en ± 6-10 min. gekleurd. De resultaten zijn in bijlage 3 opgenomen. Hoewel hieruit blijkt, dat er vrijwel geen kieming optrad, kwam toch wel tot uiting, dat na een langere kiemingsperiode het kiemingspercentage iets toenam. De oorzaak van de slechte kieming kan wellicht door één of meerdere van onderstaande veronderstellingen worden veroorzaakt:

1. De stempel verkeerde niet in het juiste rijpheidsstadium.
2. Door het castreren was het micro-klimaat (lv.h., temp.?) sterk beïnvloed vooral omdat alle bloembekleedselen waren verwijderd.
3. Het stuifmeel was niet vitaal genoeg.

Bovendien bleken er over het algemeen weinig korrels op de stempels te zijn achtergebleven. Dit kan zowel door punt 1 als door punt 2 zijn veroorzaakt. Bij het onderzoeken van de hydrolysatie-vloeistof bleken er inderdaad zeer veel korrels te zijn afgespoeld. De "kleefkracht" van het stempeloppervlak zal dus te gering zijn geweest.

Wat punt 3 betreft, bleek bij de kieming in vitro de kiemkracht veel beter te zijn dan in vivo. Gebruikt werd een recept van F.P. Smith, betreffende de kieming van leeuwebekken-stuifmeel in vitro (zie bijlage 4). De proef vond in 6-voud in Tieghemcellen plaats. Na 5½ uur werd een kiemingspercentage van gemiddeld 36,7% gevonden (bijlage 5). Dit percentage had wellicht ruim 50% kunnen bedragen, als meer stuifmeel per voedingsdruppeltje was gebruikt. Het bleek immers duidelijk, dat het los liggende stuifmeel minder kiemde, dan het stuifmeel, dat dicht opeen lag. Waarschijnlijk scheiden de korrels stoffen af of zijn aan de buitenkant van de korrels stoffen aanwezig, waarvan een kiemings-stimulerende invloed uit gaat. Een dergelijk effect is o.a. bij tomaatstuifmeel ook bekend.

Stuifmeelbezetting op de stempel.

Bovendien werd de stuifmeelbezetting op de stempel nagegaan. Hierbij werd gebruik gemaakt van stijlen van bloeiende bloemen. De helft van de bloemen werd met een penseeltje bewerkt, om na te gaan, in hoeverre deze behandeling het aantal korrels op de stempel kon doen toen<sup>e</sup>men. De stijlen werden 5 en 24 uur na de bestuiving gefixeerd. Er werd een lange kiemingsperiode aangehouden, omdat bij de vorige proef alleen na een langere tijd kieming werd waargenomen. Hierdoor kon misschien niet zo goed de kieming van het stuifmeel op de dag van onderzoek worden nagegaan, maar werd wel een indruk verkregen van de totale stuifmeelbezetting op de stempel. Bovendien werd ~~door~~ een abuis de proef niet gelijktijdig ingezet, zodat de omstandigheden niet volkomen identiek waren. De gevonden gegevens zijn alle in bijlage 6 + 6a opgenomen.

Onderstaande tabel geeft verkort de gevonden gegevens weer.

Tabel stuifmeel-bezetting en -kieming gem. per stempeldl.

	Rood + blauw x			Blauw		
	Gekiemd	Totaal	%	Gekiemd	Totaal	%
Onbestoven, na 24 uur	298	353	85	34	54	63
Bestoven , na 24 uur	1103	1189	93	74	160	49
Onbestoven, na 5 uur	158	181	87	28	52	54
Bestoven , na 5 uur	432	494	88	157	218	72

Allereerst springt naar <sup>voren</sup> ~~men~~, dat de totale kieming (dus van de rode + de blauwe korrels) goed was. De kieming lag tussen de 85 en 93%. Bovendien werd de indruk gewekt, dat het kiemingspercentage bij de bestoven bloemen iets hoger lag dan bij de niet extra bestoven bloemen. Wellicht was hierbij, evenals bij de kieming in vitro, sprake van een stimulerende invloed van de korrels op de stuifmeelkieming. Bij de totale stuifmeelbezetting bleek 24 uur na de bestuiving de bestoven bloemen  $\pm 3,5$  x zoveel korrels op de stempels te bevatten dan de niet bestoven bloemen. 5 <sup>Uur</sup> ~~Keer~~ na de bestuiving hadden de bestoven bloemen  $\pm 2,7$  x zoveel korrels op de

x opm. Niet gekiemde en pas gekiemde korrels zijn blauw. Reeds eerder gekiemde korrels zijn rood-doorzichtig.

stempel. In beide gevallen kan men dus zeggen, dat de bestuiving het aantal stuifmeelkorrels op de stempel ongeveer verdrievoudigde. Aangezien hierbij het totale aantal korrels werd geteld, is hiervan verder weinig positiefs te zeggen, omdat het beeld, door reeds eerder op de stempel gevallen korrels werd beïnvloed.

Bij de beoordeling van de blauwe korrels, bleek juist 24 uur na de bestuiving minder korrels op de stempel te zijn achtergebleven dan 5 uur na de bestuiving. Dit laat zich goed begrijpen, want 24 uur na de bestuiving zullen reeds veel korrels, die bij het inzetten van de proef op de stempel terecht kwamen, door de groei van hun kiembuizen, rood geworden zijn. 24 Uur na de bestuiving werden bijna 3 x zoveel korrels op de stempels gevonden dan bij de onbestoven stempels en 5 uur na het inzetten van de proef werden wel 4 x zoveel korrels op de bestoven stempels gevonden dan op de onbehandelde stempels. Opmerkelijk is, dat in beide gevallen de onbestoven stempels een vrijwel gelijk aantal korrels bevatte (54 en 52 korrels). Hieruit mag wellicht de conclusie worden getrokken, dat de omstandigheden bij de 2 verschillende inzet-tijden, in ieder geval wat de stuifmeelbezetting aangaat, vrijwel gelijk waren. Dat desondanks 24 uur na het inzetten van de proef minder blauwe korrels op de stempel aanwezig waren, kwam dus door het verkleuren van de korrels, zoals dit reeds hierboven is beschreven. Ook de geringe kieming, die 24 uur na het inzetten van de proef werd gevonden kan hieraan worden toegeschreven. De ongekiemde korrels, ook die meer dan 24 uur op de stempel liggen, blijven blauw en drukken dus het kiemingspercentage, vooral als bij de betere bestuiving de kiembuizen snel groeien en de korrels dus rood worden.

Hoewel de gevonden cijfers met het nodige voorbehoud beoordeeld dienen te worden, kan toch zeker wel gezegd worden, dat door de bestuiving met een penseeltje het aantal korrels op de stempel  $\pm$  verdrievoudigd <sup>kan</sup> ~~kunnen~~ worden en waarschijnlijk zelfs wel verviervoudigd t.o.v. de niet behandelde stijlen.

Tenslotte zijn in bijlage 7 4 foto's opgenomen, die een deel van de wel en niet bestoven stempels 24 en 5 uur na het inzetten van de proef, weer geven.

Hierdoor kan men zich enigszins een beeld vormen, hoe de kieming verloopt. Duidelijk zijn de geschrompelde rood gekleurde en doorzichtige korrels t.o.v. de blauwe korrels te onderscheiden. Bovendien blijkt 5 uur na de bestuiving de bestoven stempel veel meer blauwe korrels te bevatten dan de onbehandelde stempel.

### Samenvatting en Conclusie.

In deze proef werd oriënterend de stuifmeelkieming van leeuwbeekken in vivo en vitro nagegaan. Tevens werd de stuifmeelbezetting onderzocht en getracht of dit d.m.v. het bestuiven van de bloemen met een penseeltje kon worden verbeterd.

De volgende resultaten werden verkregen:

1. Voor het zichtbaar maken van de wel en niet gekiemde korrels werden de stijlen als volgt behandeld; 1 uur fixeren in alcohol-azijnzuur, hydrolyseren in 45% azijnzuur bij 60°C gedurende 20 min. en kleuren met een mengsel van safranine en aniline blauw in azijnzuur gedurende 6 à 10 min. en insluiten in glycerine gelatine.
2. Het kiemingsverloop in vivo is niet volledig nagegaan. Wel bleek, dat geruime tijd na de bestuiving (24 uur of langer) de kieming tot 85-93% kan oplopen.
3. De kieming in vitro lag gemiddeld bij de 36%, maar wellicht kan door het aanbrengen van meer stuifmeelkorrels op het kiemingsmedium de kieming tot gem. 50% oplopen.
4. De stuifmeelbezetting kan door het kunstmatig bestuiven van de stempel met een penseeltje + verdrievoudigd worden t.o.v. de onbehandelde stijlen.

juni 1962.

De Proefneemster,  
W. van Ravestijn.

Stain Technology 1958 No. 33 blz. 15-17.

Recept van L.A. Dionne en P.C. Spicer.

Gekleurd werden gekiemde pollen op stempels en stuifmeelbuizen in stijlen van: Antirrhinum, Brassica, Oenothera, Raphanus, Rosa, Solanum en Tagetes. Er werd als volgt gehandeld. De stijlen fixeren in aethylalcoholijsazijn 3:1 gedurende 1 uur. Hydrolyseren bij 60°C gedurende 5-60 min. (afhankelijk van de soort) in 45% azijnzuur. De stijl en de stempel werden onder een binoculair ontleed, in een paar druppels kleurstof geplaatst en 5-15 min. gekleurd. De kleurstof werd gemaakt door 150 mg safranine O en 20 mg aniline blauw in 25 ml warme (hete) 45% azijnzuur op te lossen. Na het kleuren het weefsel in een verse druppel kleurstof overbrengen en zachtjes onder een dekglas pletten. Aangezien anilineblauw een neerslag kan geven, de kleurstof geregeld in het gebruik filtreren. De kleuroplossing blijft enkele weken bij ~~in~~ kamertemp. goed.

#### Opmerkingen:

Stijlen, die niet direkt onderzocht worden, kunnen enkele dagen in de azijnzure-alcohol in de ijskast bewaard worden. Er zijn eveneens stijlen in 45% azijnzuur 1 week in de ijskast bewaard, nadat ze reeds gehydrolyseerd waren. Dikke weefsels kunnen in de kleurstof worden verhit. Door de kleuring worden de pollen en de kiembuizen in een jong stadium gekleurd. Oudere kiembuizen worden alleen aan het groeiende topje gekleurd. De niet gekleurde delen van de buizen hebben een glasachtig doorzichtig uiterlijk. Ze zijn door hun lengte goed herkenbaar.

Duur van de in min.		Resultaat x		
Hydroly- satie	kleuring	+	Tot.	ROOD
40	3	0	5	
40	3	0	3	
40	3	0	11	7
40	3	0	5	
40	6	0	12	
40	6	0	20	
40	6	0	3	
30	10	0	0	
30	10	0	1	
30	10	6	30	10
30	10	1	7	5
30	10	3	52	11
30	10	0	1	
30	10	0	0	
20	6	8	15	
20	6	0	5	
20	6	0	0	
20	6	0	0	
20	10	8	17	
20	10	0	2	
20	10	19	48	15
20	10	0	0	

<sup>x</sup> Verklaring.

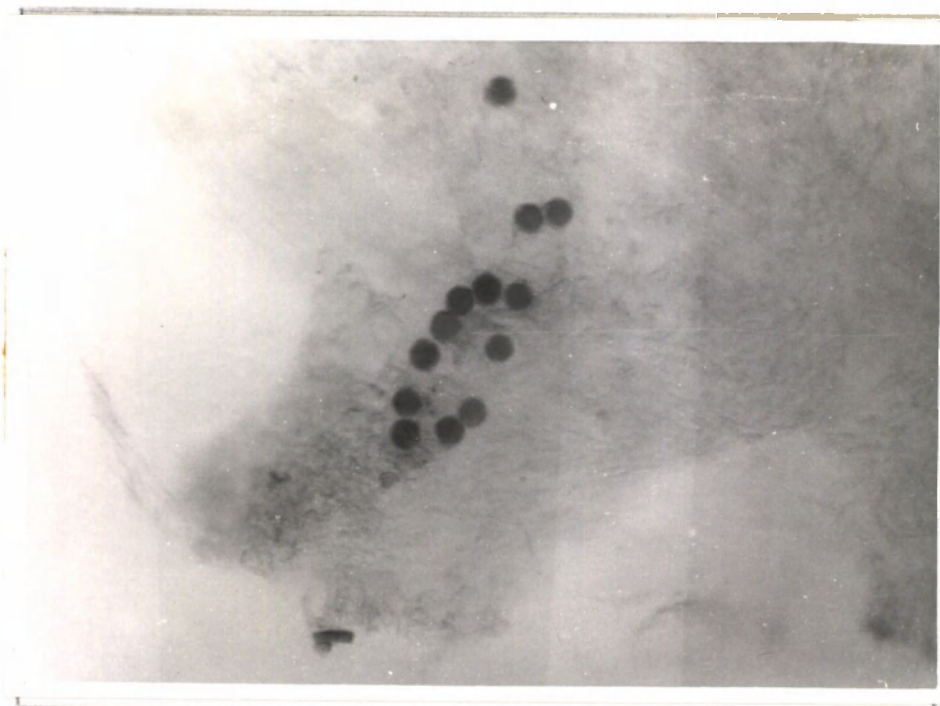
+ = aantal gekiemde korrels.

tot. = totaal aantal korrels.

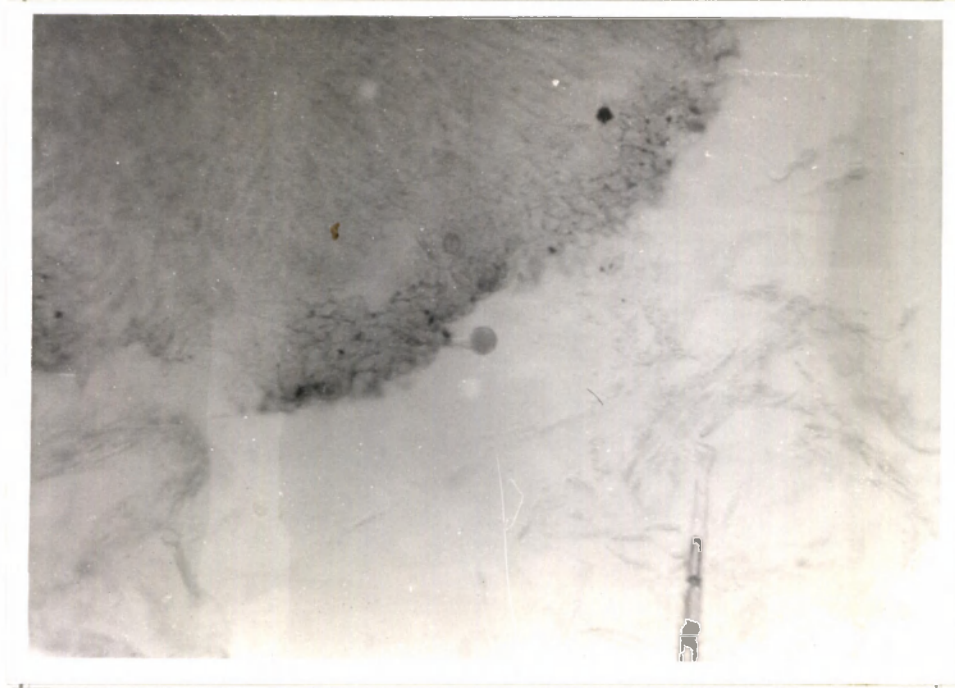
rood = aantal rood gekleurde korrels.



Stuifmeel op de stempel.



Ongekiemde stuifmeelkorrels op de stempel. De korrels zijn donker blauw gekleurd.



Een gekiemde stuifmeelkorrel op de stempel. De korrel is licht blauw gekleurd, de kiembuis is doorzichtig en rood.

stijl:	2 uur		4 uur		8 uur		24 uur		
	+	tot.	+	tot.	+	tot.	+	tot.	
1	0	30	0	1	0	2	2	4	Gecastreerd op 9/5-87. Bestoven op 12/5-'61 te 8.30 u.
2	0	7	1	1	0	1	0	1	
3	0	0	0	1	2	54	0	0	
4	0	32	0	32	0	2	0	6	
5	0	0	0	0	0	23	0	5	
6	0	3	0	2	0	4	0	12	
7	0	0	0	8	0	2	0	0	
8	0	2	0	2	0	6	0	1	
9	0	0	0	10	0	5	0	0	
10	0	0	0	0	0	1	0	7	
11							0	0	
12							0	1	
13							0	0	
Tot.	0	74	1	57	2	100	2	37	
+ %	0,0%		1,7%		2,0%		5,4%		

Opm.

+ = aantal gekiemde korrels.

tot. = totaal aantal korrels.

+ % = kiemingspercentage.

Amer. Journal of Botany. Vol. 29-1942 jan. blz. 56-66.

F.P. Smith. Studies of the growth of pollen with respect to temperature, auxins, colchicine and vit. B<sub>1</sub>.

Het stuifmeel van leeuwebekken kiemt het beste op een medium, dat 10% suiker (saccharose), 1:100.000 3 indoleazijnzuur en 0,75% agar bevat. Bij hogere groeistof concentraties werkt de groeistof giftig, bij lagere concentraties minder effectief. De kiemingsduur is  $\pm 5\frac{1}{2}$  uur. Men kan de groei stoppen door het dekglas op een plaat van 50°C te leggen. Na 3 à 5 min. is de overtollige vloeistof verdwenen en kan men het materiaal in aceto-carmijn insluitmedium (Zirkle 1937) insluiten.

De geschiktste kiemtemperatuur is 25°C. Bij 30°C barsten de pollen. Het stuifmeel van de verschillende meeldraden van één bloem verschilt weinig in kiemkracht bij leeuwebekken. Bij andere gewassen is dit veelal niet het geval.

12 mei 1961.

Druppel	% gek.	
1	4	} los liggende korrels.
2	20	
3	19	
4	60	} stuifmeelkorrels op hoopjes.
5	53	
6	64	
Gem.	36,7	

Opm.

% gek. = kiemingspercentage.

Gem. = gemiddeld kiemingspercentage.

Kieming vond in Tieghemcellen plaats. Kiemingstemp. was  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ . Kiemingsduur  $5\frac{1}{2}$  uur. Kiemingsmedium bestond uit; 10% suiker (saccharose), 1:100.000 (=0,01%) 3 indole-azijnzuur en 0,75% agar alle in aqua dest opgelost. Het tellen vond direkt na het verlopen van de kiemingsperiode plaats.

stijl	24 uur, onbestoven			24 uur, bestoven			5 uur, onbestoven			5 uur, bestoven		
	rood	rood + blauw		rood	rood + blauw		rood	rood + blauw		rood	rood + blauw	
	+	+	tot.	+	+	tot.	+	+	tot.	+	+	tot.
1	245	371	472	1324	1506	1612	0	0	2	234	370	469
2	0	0	11	745	778	837	108	137	175	100	172	206
3	0	0	2	723	790	998	0	1	4	726	985	1204
4	266	319	379	692	705	797	318	441	492	304	480	527
5	63	69	84	752	768	834	82	110	157	463	687	680
6	148	197	226	1745	1817	1871	221	239	262	139	201	230
7	76	188	245	965	992	1063	148	205	268	353	559	603
8	560	626	660	978	1008	1085	0	0	3	141	272	327
9	684	771	1043	733	753	832	2	5	12	216	332	474
10	563	594	728	575	584	603	1	2	5	223	298	326
11	0	0	1	963	1035	1099	197	249	277	59	77	96
12	142	166	234	846	864	943	0	1	4	49	74	82
13	523	575	666	1173	1300	1364	776	846	909	495	790	849
14	0	0	1	950	1185	1280	1	1	2	126	172	205
15	0	1	5	1635	1766	1830	53	96	116	117	172	190
16	348	398	520	798	872	942	3	8	9	237	279	293
17	0	0	1	1146	1204	1279	0	0	0	282	313	348
18	844	917	1087	869	921	1007	0	0	3	254	421	495
19	1010	1099	1183	906	958	1046	767	919	1022	252	325	375
20	0	0	2	1353	1505	1620	755	901	984	423	726	861
21	538	556	625	1783	1842	2014	0	0	0	390	716	803
22	20	29	33	989	1110	1198	54	82	106	390	616	670
23	553	561	578				0	0	2	323	731	723
24	0	0	12				0	3	32	217	314	362
25	13	21	22				0	0	14	374	723	844
26							0	0	0			
27							8	12	40			
Tot.	6596	7458	8820	22643	24263	26154	3504	4258	4900	6887	10805	12342
% +	85			93			87			88		
Gem. per stijl	264	298	353	1029	1103	1189	130	158	181	275	432	494
Tot.bl.		862	1362		1620	3511		754	1396		3918	5455
% +	63			49			54			72		
Gem. per stijl		34	54		74	160		28	52		157	218

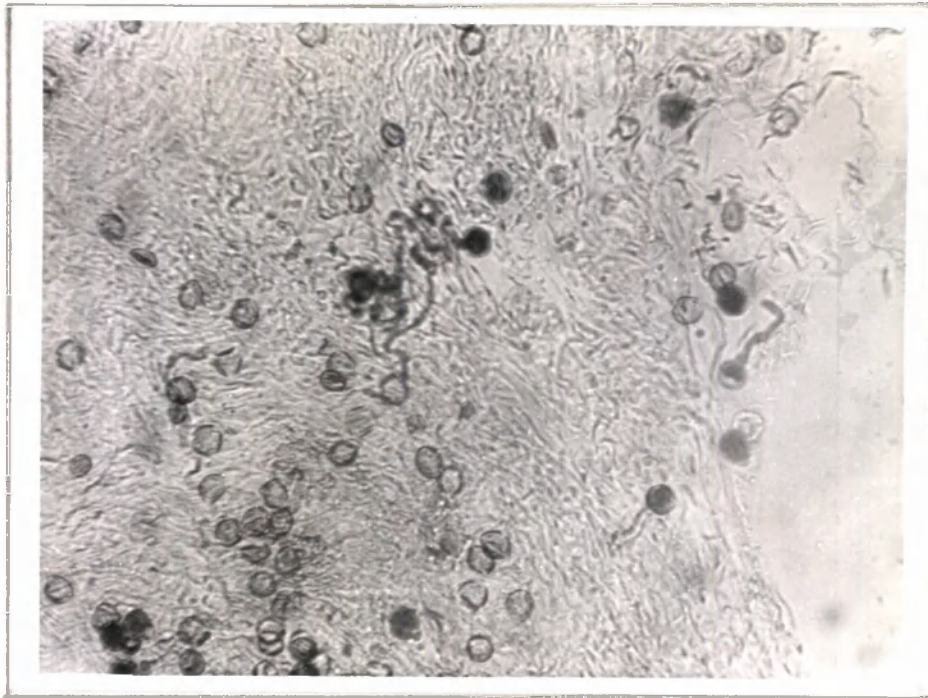
	Rood + blauw			Blauw			
	+	Tot.	%	+	Tot.	%	
Tot.	7458	8820	85	862	1362	63	Onbestoven, na 24 uur.
Per stijl	298	353		34	54		
Tot.	24263	26154	93	1620	3511	49	Bestoven, na 24 uur.
Per stijl	1103	1189		74	160		
Tot.	4258	4900	87	754	1396	54	Onbestoven, na 5 uur.
Per stijl	158	181		28	52		
Tot.	10805	12342	88	3918	5455	72	Bestoven, na 5 uur.
Per stijl	432	494		157	218		

Opm.

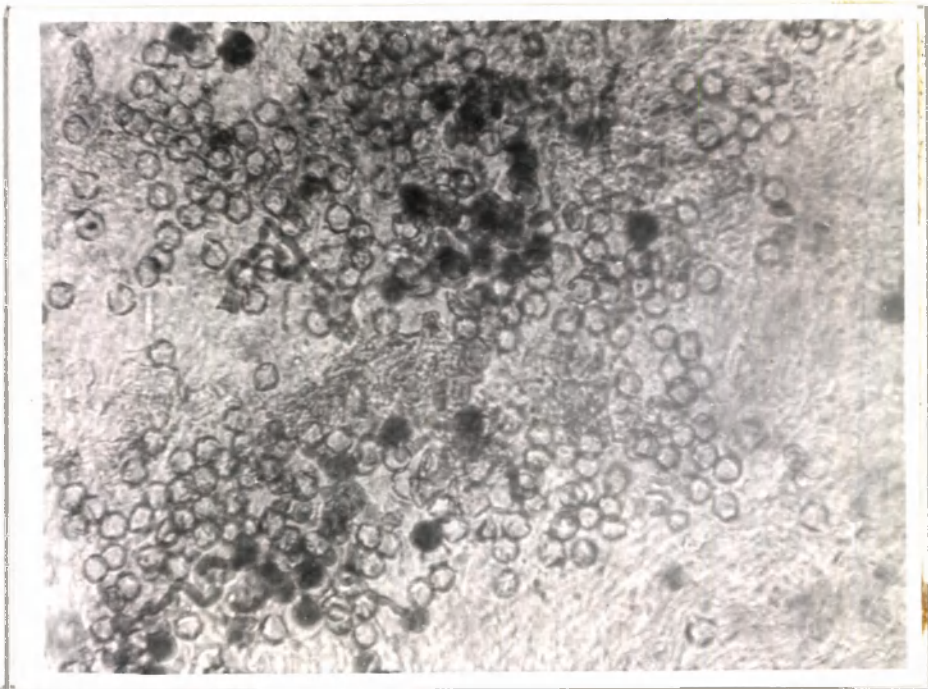
24 uur. Ingezet op 8 juni 1961 te 10 uur. Gefixeerd op 9 juni 1961 te 10 uur.

5 uur. Ingezet op 9 juni 1961 te 11 uur. Gefixeerd op 9 juni 1961 te 16 uur.

Kieming in vivo, 24 uur na het inzetten van de proef.



Onbestoven.



Bestoven.

