



# HOOFSTUK 1

## INLEIDING

**Genesis 1:29** *Verder het God gesê: Ek gee nou aan julle al die plante wat saad gee,  
wat op die hele aarde is, ....*

## INLEIDING

Sikadeë is bekend as die primitiefste lewende saaddraende plante en behoort aan die orde Cycadales. Hierdie orde het gefloreer in die Mesosoïese-tydperk, 50 tot 60 miljoen jaar gelede (Adinolfi *et al.* 1991). Gedurende hierdie periode is 'n warm en vogtige klimaat beleef en steenkoolneerleggings is op aarde gevorm (Giddy 1984). Die resente lewende sikadeë het sedert hul ontstaan, morfologies baie min verander en kan heel waarskynlik beskryf word as die Coelacante van die plantewêreld (Giddy 1984).

Slegs tien genera wat tot drie families behoort, is tans lewend. In totaal sluit dit ongeveer 150 spesies in wat regdeur die tropiese en gematigde dele van die wêreld versprei is. In die verlede is al die lewende sikadeë in een familie geklassifiseer, maar in 1959 verhef L.A.S. Johnson in "Proceedings of the Linnaean Society of New South Wales" die generiese naam *Cycas* tot die familienaam Cycadaceae met *Cycas* as die tiperende genus en skep ter selfdertyd die familienaam Stangeriaceae vir die monotipiese Suid-Afrikaanse genus *Stangeria* (Giddy 1984). Die familienaam Zamiaceae word vir al die oorblywende genera, naamlik *Zamia*, *Dioon*, *Ceratozamia*, *Microcycas*, *Macrozamia*, *Lepidozamia*, *Bowenia* en *Encephalartos* gebruik (Giddy 1984).

Verteenwoordigers van die genus *Encephalartos* Lehm., staan in Suid-Afrika algemeen as broodbome bekend. Die populariteit van broodbome as tuinplante en die feit dat die besit van ou eksemplare 'n statussimbool geword het, het daartoe bygedra dat die plantsoorte tans skaars en bedreig is. Voortplanting in die natuurlike habitat het by sekere spesies feitlik tot stilstand gekom as gevolg van die verkleining van populasies (Giddy 1984). Ongemagtigde uithaal van baie ou eksemplare in die Oos-Kaap het gelei tot 'n reusagtige skandaal (Pieters 1995). 'n Goeie voorbeeld van 'n spesie wat glad nie meer in die

natuurlike staat aangetref word nie, maar slegs in botaniese tuine gesien kan word, is *E. woodii*. *E. woodii*-plante is almal manlik met die gevolg dat die spesie nie meer deur middel van saad voortgeplant kan word nie en die voortbestaan van vegetatiewe voortplanting afhanklik is. As gevolg van hul bedreigde status word alle *Encephalartos*-spesies deur 'n plantbeskermingsordonnansie van die onderskeie Provinsiale Administrasies beskerm. Elke provinsie is tans besig om hulle eie ordonnansies te hersien.

Geslagtelike voortplanting word beperk deur die feit dat die plante tweehuisig is, nie elke jaar keëls vorm nie en die voortbring van keëls by die twee geslagte nie altyd gesinchroniseer is nie. Om die plantsoort van uitsterwing te red, het kunsmatige bestuiwing of handbestuiwing van die keëls reeds feitlik standaardpraktyk geword (Stalmans 1995, Onbekend 1988 & 1992).

Alhoewel daar reeds stuifmeelbanke bestaan waar stuifmeel geberg en deur lede van die Broodboom Vereniging van Suid-Afrika bekom kan word, is wetenskaplike gegewens ten opsigte van die berging van *Encephalartos*-stuifmeel egter skaars. Slegs beperkte gegewens is beskikbaar (Osborne *et al.* 1992 en ongepubliseerde data).

Sistematiese navorsing oor stuifmeelberging het reeds aan die einde van die 19 de eeu begin. Roemer het in 1915 gevind dat stuifmeel wat by lae temperature geberg word, hulle kiemkragtigheid beter behou as wanneer stuifmeel by hoë temperature geberg word (Stanley & Linskens 1974). Literatuur oor die berging van stuifmeel is hersien in die vyftiger en sestiger jare deur Visser (1955), Johri & Vasil (1961) en Linskens (1964).



Afgesien van temperatuur kan faktore soos relatiewe humiditeit (RH) (Aguëguia & Fatokun 1988, Ciampolini *et al.* 1991, MacFarlane Smith *et al.* 1989) en bergingstydperk ook die lewenskragtigheid van stuifmeel beïnvloed (Shivanna & Johri 1985; Stanley & Linskens 1974). Eksperimente met homogene stuifmeelmonsters wat by verskillende humiditeite geberg is, het getoon dat die lewenskragtigheid van die stuifmeel oor die algemeen negatief korreleer met die RH gedurende berging (Stanley & Linskens 1974). Baie spesies se stuifmeel verloor hulle lewenskragtigheid vinniger by baie hoë of baie lae RH. Mishra en Shivanna (1982) vergelyk die doeltreffendheid van organiese oplosmiddels tydens berging van stuifmeel van vyf peulplantsoorte. Die genera *Crotolaria*, *Lathyrus*, *Trigonella*, *Vicia* en *Pisum* se stuifmeel, is by lae temperature en verskeie relatiewe humiditeite in organiese oplosmiddels soos dietieleter, sikloheksaan, amielalkohol en asetoon geberg. Stuifmeelkorrels van *Lilium* spp. en *Camellia* spp. wat in organiese oplosmiddels geberg is, vorm aansienlik langer stuifmeelbuise in vergelyking met die kontroles wat nie in organiese oplosmiddels geberg is nie (Shivanni & Johri 1985).

Die eerste poging om peer- en appelstuifmeel te vriesdroog is in 1955 deur Visser aangewend. Hy slaag daarin om peer- en appelstuifmeel suksesvol te vriesdroog. Stuifmeel van verskillende spesies varieer in hulle vermoë om vriesdroging en vakuumdroging te weerstaan (Davies & Dickinson 1971; King 1965; Layne & Hagedorn 1963; Stanley & Linskens 1974).

Berging van stuifmeel by baie lae temperature kan verkry word deur gebruik te maak van vloeibare stikstof ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Bowes 1990). Chemiese reaksies wat normale selbeskadiging veroorsaak, word deur die metode totaal geïnhibeer (Shivanna & Johri 1985). Visser (1955)

het dan ook suksesvol stuifmeel van *Pyrus malus*, *Lycopersicon esculentum* en *Rhododendron catawbiense* vir twee jaar in vloeibare stikstof geberg. *Zea mays*-stuifmeel se lewensduur is by heersende dagtemperatuur beperk tot slegs 'n paar uur. In vloeibare stikstof (Barnabas & Rajki 1976) kan die stuifmeel egter al vir langer periodes (365 dae) geberg word.

Baie navorsing is op ander Gymnosperm-stuifmeel gedoen en in besonder op die van *Pinus* spp. (Stanley & Linskens 1974). Stuifmeel van *P. avium* (*cerasus*) is vir 1460 dae by 'n temperatuur van 2° C tot en met  $\pm 8$  ° C en RH van 50% geberg. *P. communis*-stuifmeel (Stanley & Linskens 1974) is geberg vir 3287 dae by 'n temperatuur van -17° C en -37° C en RH van 5%. Katoenstuifmeel (*Gossypium hirsutum*) kan egter nie by baie lae temperature soos in vloeibare stikstof (-196° C) of by 5° C geberg word nie (Stanley & Linskens 1974). Hierdie stuifmeel verloor hulle lewenskragtigheid baie gou by lae temperature (Rodriquez-Garrey & Barrow 1986). Vir *Gossypium hirsutum* se stuifmeel is 'n RH van 100% en 15° C die optimale toestand vir berging. Korttermynberging van stuifmeel is 'n bekende gebruik, veral in kommersiële vrugteproduksie en in die saadboordbestuur van die Departement Bosbou in Frankryk (Cerceanu-Larrival & Challe 1986). Volgens laasgenoemde outeurs is langtermynberging van lewenskragtige stuifmeel 'n noodsaaklikheid vir die behoud van genetiese bronne.

*In vitro*-kiemingstoetse kan 'n aanduiding gee van kiemkragtigheid en lewenskragtigheid (Stanley & Linskens 1974) van stuifmeelkorrels. Vir *in-vitro* toetse word 'n kiemingsmedium benodig (Krell *et al.* 1987). Verskeie substrate kan gebruik word waarin sukrose en boorsuur die belangrikste komponente is (Stanley & Linskens 1974). Uit die literatuur blyk dit dat hoofsaaklik drie faktore 'n kardinale rol speel by die berging van stuifmeel, naamlik



temperatuur, RH en opbergingsyd.

Van der Merwe (ongepubliseerde skripsie, Universiteit van Pretoria) het 'n voorlopige studie gedoen op die berging van stuifmeel van sekere *Encephalartos*-spesies. Hierdie studie het as gidsstudie vir die huidige ondersoek gedien. 'n Bruikbare tegniek vir die bepaling van die kiemkragtigheid van stuifmeel het tot en met die aanvang van hierdie navorsing, nog nie bestaan nie en gebergde stuifmeel moes op goedertrou vir bestuiwing gebruik word. Dit is dus noodsaaklik om 'n eenvoudige tegniek daar te stel sodat die redelik onervare persoon die tegniek kan toepas. Die *in vitro*-toetse moet so saamgestel word dat dit maklik uitvoerbaar is. Hierdie studie is veral gemik om as praktiese handleiding vir bestaande kwekers en voornemende kwekers van broodbome te dien.

Die doel van hierdie ondersoek is om die gunstigste toestande waaronder berging van *Encephalartos*-stuifmeel plaasvind te bepaal en aanbevelings te maak vir die effektiewe berging van broodboomstuifmeel. Geslaagde berging sou beteken dat stuifmeel beskikbaar sal wees wanneer die vroulike keëls gereed is vir bestuiwing. Verder sal die stuifmeel se kiemkragtigheid getoets kan word, voordat dit vir bestuiwing beskikbaar gestel word en verseker dat die stuifmeel nie onnodig weggegooi word nie of vroulike keëls onwetend met dooie stuifmeel bestuif word.

In hierdie studie is vier *Encephalartos*-spesies se stuifmeel ondersoek, naamlik:

- \* *E. caffer* (Thunb.) Lehm.
- \* *E. eugene-maraisii* Verdoorn subsp. *eugene-maraisii* Lavranos & Goode
- \* *E. ferox* Bertol. f.
- \* *E. lehmannii* Lehm.

## VERWYSINGS

- ADINOLFI, M., CORSARO, M.M., MANGONI, L. & PARRILLI, M. 1991. Studies of an acidic polysaccharide from *Encephalartos friderici guilielmi*. *Carbohydrate Research* 222: 215-221.
- AQUEQUIA, A. & FATOKUN, C.A.. 1988. Pollen storage in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). *Euphytica* 39: 195-198.
- BARNABAS, B. & RAJKI, E. 1976. Storage of maize (*Zea mays* L.) pollen at -196° C in liquid nitrogen. *Euphytica* 25: 747-752.
- BOWES, S.A. 1990. Long-term storage of *Narcissus* anthers and pollen in liquid nitrogen. *Euphytica* 48: 275-278.
- CERCEAU-LARRIVAL, M. & CHALLE, J. 1986. Biopalynology and maintenance of germination capacity of stored pollen in some angiosperm families. In: *Pollen and spores: form and function*. ed. Blackmore, S. & Ferguson, I.K. Academic Press, London.
- CIAMPOLINI, F. SHIVANNA, K.R. & CRESTI, M. 1991. High humidity and heat stress causes dissociation of endoplasmic reticulum in tobacco pollen. *Bot. Acta* 104: 110-116.
- DAVIES, M.D. & DICKINSON, D.B. 1971. Effects of freeze-drying on permeability and respiration of germinating lily pollen. *Physiol. Plant*, 24: 5-9.
- GIDDY, C. 1984. Cycads of South Africa. 2nd rev. edn. C. Struik, Cape Town.
- JOHRI, B.M. & VASIL, I.K. 1961. Physiology of pollen. *Bot. Rev.* 27: 325-381.
- KING, J.R. 1965. The storage of pollen particularly by the freeze-drying method. *Bull. Torrey bot. Club* 92: 270-287.
- KRELL, S.L., STEPHENS, L.C. & WEIGLE, J.L. 1987. In vitro pollen germination to determine pollen viability of *Impatiens* interspecific hybrids. *Hort. Sci.* 22: 1073-1073.
- LAYNE, R.E.C. & HAGEDORN, D.J. 1963. Effect of vacuum-drying, freeze-drying and storage environment on the viability of pea pollen. *Crop Sci* 3: 433-436.

- LINSKENS, H.F. 1964. Pollen physiology. *A. Rev. Pl. Physiol.* 15: 255-256.
- MACFARLANE SMITH, W.H., JONES, J.K. & SEBASTIAMPILLAI, A.R. 1989. Pollen storage of *Fragaria* and *Potentilla*. *Euphytica* 41: 65-69.
- MISHRA, R. & SHIVANNA, K.R. 1982. Efficacy of organic solvents for storing pollen grains of some leguminous taxa. *Euphytica* 31: 991-995.
- Onbekend: Pollination success. 1988. In: Bits and Pieces, *J. Cycad Soc. S. Afr.* 13: 40
- Onbekend: Pollination: Wet or Dry? 1992. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 31: 38
- OSBORNE, R. ROBBERTSE, P.J. & CLAASSEN, M.I. 1992. The longevity of cycad pollen in storage. *S. Afr. J. Bot.* 58: 250-254.
- PIETERS, M. 1995. Dertig ton bome van R4 miljoen vir Casino. ANC het glo sy verlof gegee. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 42: 30-31.
- RODRIQUEZ-GARAY, B. & BARROW J.R. 1986. Short-term storage of cotton pollen. *Plant Cell Rep.* 5: 332-333.
- SHIVANNA, K.R. & JOHRI, B.M. 1985. The Angiosperm Pollen: structure and function. Wiley Eastern Ltd. New Delhi.
- STALMANS, M. 1995. Handpollination of *Encephalartos heenanii* in the Songimvelo Game Reserve, Mphumalanga Province. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 44: 23-24.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.
- VISSER, T. 1955. Germination and storage of pollen. *Meded. Landb-Hooges.* 55: 1-68.



## HOOFSTUK 2

### ALGEMENE BOU, GEOGRAFIESE VERSPREIDING EN MORFOLOGIESE BOU VAN VIER *ENCEPHALARTOS*- SPESIES.

\* ALGEMENE BOU VAN *ENCEPHALARTOS*-STUIFMEEL

\* GEOGRAFIESE VERSPREIDING EN MORFOLOGIESE BOU VAN:

1) *E. caffer*

2) *E. eugene-maraisii*

3) *E. ferox*

4) *E. lehmannii*

\* FIGUURBLAD

\* VERWYSINGS



## ALGEMENE BOU VAN *ENCEPHALARTOS*-STUIFMEEL

SEM-studies toon dat *Encephalartos*-stuifmeel in die medium grootte (25-49  $\mu\text{m}$ ) groep val (Marshall *et al.* 1989). Daar is ook nie 'n groot variasie in grootte tussen eksimplare van dieselfde spesie uit verskillende habitate nie. Al die stuifmeel van die verskillende spesies is karakteristiek bootvormig (Figuur 2.1), met variasie in lengte en breedte, monosulkaat, bilaterale stuifmeelkorrels (Dehgan & Dehgan 1985). Stuifmeel van *E. caffer* (Thunb.) Lehm., *E. eugene-maraisii* Verdoorn, *E. ferox* Bertol. f. en *E. lehmannii* Lehm. wat in hierdie studie gebruik is, is verleng en die proksimale kant is konveks. Die lengte van hierdie stuifmeel wissel tussen 32,5-36,1  $\mu\text{m}$  en die wydte tussen 19,1-20,2  $\mu\text{m}$  (Marshall *et al.* 1989).

Volgens Marshall *et al.* (1989) het net stuifmeel van *E. lehmannii* op die proksimale kant klein gaatjies in die wandskulptuur. Die ander drie spesies in hierdie studie toon 'n band met klein gaatjies op die proksimale kant van die wandskulptuur. Al vier stuifmeelspesies is op die distale kant glad. Die wandskulptuur van die vier spesies is almal breinagtig (Figuur 2.2).

## GEOGRAFIESE VERSPREIDING EN MORFOLOGIESE BOU VAN VIER SPESIES

### 1) *Encephalartos caffer* (Thunb.) Lehm.

*E. caffer* broodbome kom die verste suid in Suid-Afrika en dus die verste suid in Afrika voor. Hierdie spesie is saam met *E. longifolius* van die eerste broodbome wat in Suid-Afrika beskryf is (Kemp 1985).

## **Verspreiding:**

Eksemplare van *E. caffer* kom in hulle natuurlike staat in die Oos-Kaap, in die distrikte van Humansdorp, Albany, Bathurst en Oos-Londen en die Transkei in die distrik van Kentani tot so ver oos as Willowvale voor. Hierdie plante groei in suur grasveld, dikwels tussen rotse. Die reënval in hierdie verspreidingsgebiede wissel tussen 1000 mm by die kus tot 750 mm en minder binnelands. Somers is warm. Winters is matig tot koel met geen ryp wat in hierdie gebiede voorkom nie (Jones 1993).

## **Beskrywing van die plant:**

**Stam:** 'n Ondergrondse stam wat 30 cm tot 40 cm lank en 20 tot 25 cm breed kan wees, kom voor. Soms steek 'n klein gedeelte van die stam bo die grond uit en die kroon van die stam is altyd wollerig. Die stam is normaalweg onvertak, maar met beskadiging is vertakking van die stam wel al waargeneem. Karakteristiek van die spesie is die knolagtige wortelsisteem wat uit verskeie kort, dik wortels bestaan.

**Blare:** Blare van *E. caffer* is 40 cm tot 100 cm lank en liggroen van kleur (Kemp 1985). Die jong blare is eers wollerig en bruin en raak nooit volkome glad en blink nie, al verloor die blare baie van die hare soos wat die blare ouer word. Die ragis van die blaar is gewoonlik reguit maar soms kan die ragis wel gedraai of gebuig wees (Figuur 2.3). Indien baie blare teenwoordig is, sal die blare wat nader aan onder is, amper horisontaal gedra word (Giddy 1984). Die pinnas in die middel is 8 cm tot 10 cm lank en ongeveer 1cm breed.

**Keëls:** Beide manlike sowel as vroulike plante dra elk een keël wat groengeel van kleur is wanneer dit volwasse is. Die keël word op 'n kort, dik stam gedra. Manlike keëls kan 20 cm tot 30 cm lank en 7 cm tot 12 cm in deursnee wees (Figuur 2.4). Die vroulike keëls is 30 cm lank en 15 cm in deursnee. Skubbe van die vroulike keël is in ses tot agt spirale gerangskik



(Figuur 2.5). Hierdie skubbe het 'n plat, terminale faset met 'n effens geligte en getande kant.

**Sade:** Helder rooi en glansend.

## 2) *Encephalartos eugene-maraisii* Verdoorn subsp. *eugene-maraisii*

**Lavranos & Goode.**

### **Verspreiding:**

Die Waterberg-broodbome is beperk tot 'n klein area op die Polala-plato na die noordweste van Naboomspruit by 'n hoogte van 1450 m bo seespieël. Baie koue winters word hier beleef met 'n reënval wat wissel tussen 625 mm tot 750mm (Lavranos & Goode 1988).

### **Beskrywing van die plant:**

**Stam:** Die stam oorskrei selde 250 cm wanneer regop. Indien die stam langer is, word die plante leunend. Die deursnee van die stam met sy klein, reëlmatige blaarbasisse is 30 cm tot 45 cm.

**Blare:** Die blare is 100 cm tot 150 cm lank en het 'n silwerblou kleur. Blare word met ouderdom geel. Die blaarsteel is reguit maar 'n derde van die punt af krom opwaarts. Die blare spreid uit en word amper horisontaal ten opsigte van die kroon gedra. Pinnae in die middel van die blaar is 15 cm tot 20 cm lank en 1,5 cm breed. Pinnae is gewoonlik gaafrandig maar kan laer af op die rand een tot twee tande besit (Osborne 1989). Die pinnae word kleiner na onder en laat die onderste 15 cm van die blaarsteel kaal tot by die basis (Koeleman *et. al.* 1981).

**Keëls:** Tot agt manlike keëls en ses vroulike keëls op plante is al waargeneem. Die keëls is groengrys met 'n digte laag bruinrooi hare wat 'n algemene donker bruinrooi voorkoms aan

die keëls gee. Manlike keëls is 20 cm tot 40 cm in deursnee (Figuur 2.6) en het 'n onaangename reuk wanneer hulle volwasse is. Vroulike keëls is 30 cm tot 50 cm lank en 16 cm tot 20 cm in deursnee (Figuur 2.7) (Giddy 1984).

**Sade:** Die kleur van die sade is ligte bruin (Giddy 1984, Jones 1993) en die sade staan algemeen bekend as wildedadels in die gebied waar hulle voorkom (Giddy 1984).

### 3. *Encephalartos ferox* Bertol. f.

**Verspreiding:** Hierdie broodbome kom voor in Natal en Mosambiek. Groot getalle kom in die kusgebied van KwaZulu/Natal en noordwaarts tot in Mosambiek voor. Hulle groei gewoonlik in die skadu van die duin-plantegroei. Op die sandduine, in die natuurlike habitat, is die stam dikwels begrawe in die sand en humuslaag (Giddy 1984, Jones 1993). Reënval wissel van 1 000 mm tot 1 250 mm per jaar en geen ryp kom voor nie (Giddy 1984).

#### **Beskrywing van die plant:**

**Stam:** Laaggroeiende plante met stamme wat selde 100 cm tot 200 cm in hoogte oorskry en 'n deursnee van 25 cm tot 30 cm het (Osborne 1987).

**Blare:** Die blare is 100 cm tot 200 cm lank en is glansend groen. Die mediane pinna's is 15 cm lank en 3,5 cm tot 5 cm breed met 2 tot 4 gelobde tande op beide rande.

**Keëls:** Hierdie plante dra 'n groot hoeveelheid keëls, tot tien op 'n manlike plant en soveel soos vyf op 'n vroulike plant. Die keëls is gewoonlik 'n helder rooi, maar goud-geel keëls kom voor in sekere lokaliteite in Mosambiek. Manlike keëls is 40 cm tot 50 cm in lengte en 8 cm tot 10 cm in deursnee (Figuur 2.8). Vroulike keëls is 25 cm tot 50 cm lank en 20 cm tot 40 cm in deursnee (Figuur 2.9).

**Sade:** Donker, glansend rooi.

#### 4. *Encephalartos lehmannii* Lehm.

**Verspreiding:** Endemies tot Suid-Afrika, waar hierdie plante in die Karoo-gebiede van Pearston en Bedford weswaarts deur Uitenhage, Steytlerville tot naby Willowmore, voorkom (Jones 1993). Hulle groei hoofsaaklik op sandsteenheuwels tussen *Euphorbia*- en Karoo-struikgewasse. Somerreënval is laag, selde meer as 350 mm met lang periodes van droogte en koue winters (Kemp 1985).

#### **Beskrywing van die plant:**

**Stam:** Die spesie se stam is tot 150 cm lank en stamme van 200 cm en langer is baie raar (Kemp 1985). In deursnee is die stam 25 cm tot 45 cm (Figuur 2.10). Die blaarbasisse is groot en die kroon het 'n kenmerkende geel kraag waar die blaarsteel en die stam mekaar raak. Vertakking van die stam is algemeen (Kemp 1985).

**Blare:** Die blare is 100 cm tot 150 cm lank en sluit die blaarsteel in wat tot 25 cm lank kan wees. Die ragis is styf en amper reguit, behalwe vir die punt, wat effens terug buig of sywaarts gedraai kan wees. Die blaarbasis is groot en het 'n opvallende rooibruin tot geelbruin kraag. Die blare is grysblou van kleur wanneer hulle jonk is en mag groen word na mate hulle ouer word. Die pinnas in die middel van die blaar is ongeveer 12 cm tot 18 cm lank en 1,5 cm tot 2 cm in deursnee. Die pinnas nader aan die punt en basis van die blaar is kleiner. Pinnas is gewoonlik sonder tande, alhoewel 'n tand nou en dan wel op die rand kan voorkom (Kemp 1985).

Die pinnas is so geheg aan die ragis dat hulle horisontaal georiënteerd is ten opsigte van die ragis maar vorm 'n V ten opsigte van die blaar. Die pinnas is reëlmatig gespaseer, veral na die basis van die blaar. Na die punt is hulle nader aan mekaar, maar oorvleuel selde. Die blare van die saailinge is kort met relatief min pinnas (8 of 10). Saailinge se pinnas het 'n



aantal tande op die punt. Die saailinge se pinnas is ook reëlmatig gespaseerd (Kemp 1985).

**Keëls:** Enkel keëls kom voor by manlike en vroulike plante. In beide geslagte is die kleur van die keëls swartrooi as gevolg van kort, swart hare wat die punt van die keëls se skubbe bedek (Giddy 1984, Kemp 1985). Die keëlskubbe is groen van kleur onder die laag hare. Keëls word gedra op 'n kort steel. Manlike keëls is min of meer silindervormig, maar is nouer na die basis en die punt (Figuur 2.11). Manlike keëls is 25 cm tot 35 cm lank en 8 tot 10 cm in deursnee. Vroulike keëls is min of meer vaatjievormig en is 30 tot 50 cm lank met 'n deursnee van 15 to 25 cm (Figuur 2.12) (Kemp 1985).

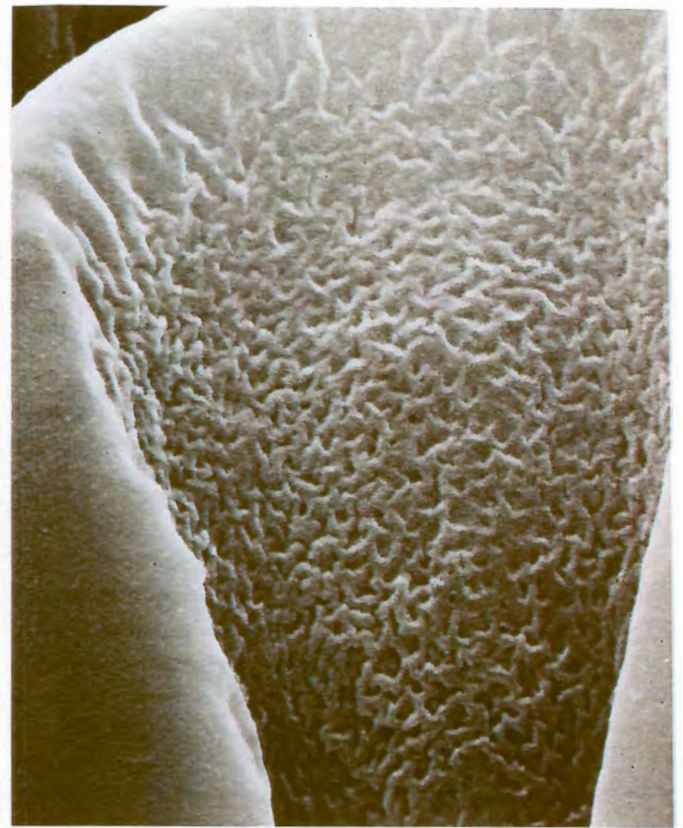
**Sade:** Vars sade is helder rooi.

# FIGUURBLAD





2.1



2.2



2.3

**Figuur 2.1-2.3** 2.1: 'n Distale aansig van *Encephalartos*-stuifmeel om die bootvormigheid van dié stuifmeel aan te dui.  $\times 3\ 500$  2.2: Oor die langer ekwatoriale aksis is die sulkus met duidelik breinagtige wandskulptuur.  $\times 14\ 000$  2.3: 'n Jong plant van *E. caffer* wat reeds die draai van die ragis illustreer (Foto dr. M.I. Claassen).





2.4



2.6



2.5

**Figure 2.4-2.6** 2.4: 'n Manlike keël van *E. caffer* (Foto dr. M.I. Claassen). 2.5: 'n Vroulike keël van *E. caffer* afgeneem in Trappe's Valley (Foto prof. P.J. Robbertse). 2.6: Manlike keëls van *E. eugene-maraisii* (Foto dr. M.I. Claassen).



2.7



2.8



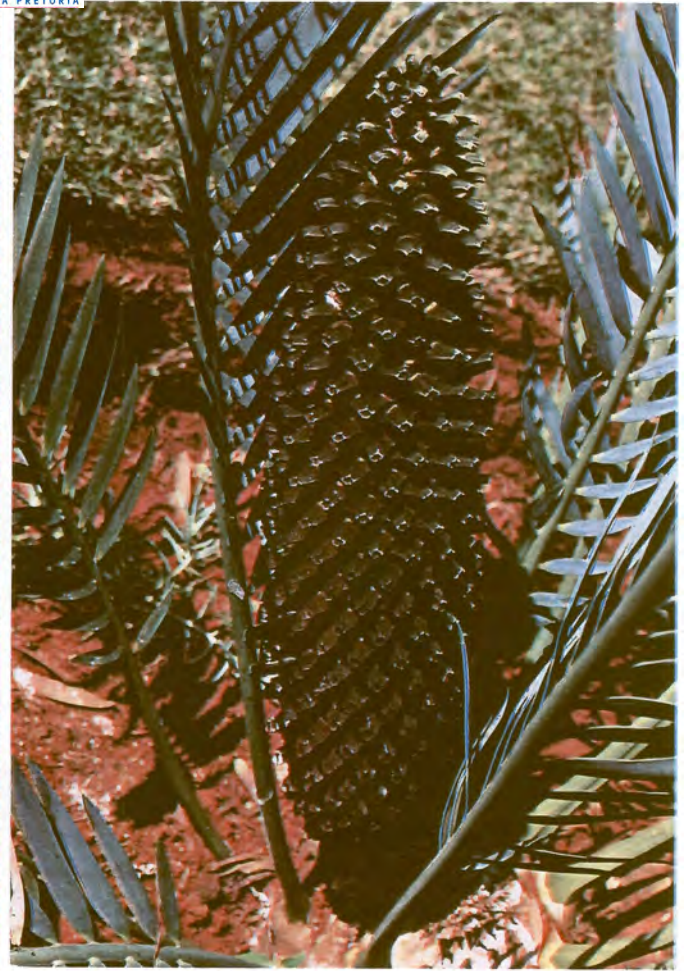
2.9

**Figure 2.7-2.9** 2.7: Vroulike keëls van *E. eugene-maraisii* (Foto dr. M.I.Claassen). 2.8: Manlike keëls van *E. ferox* (Foto dr. M.I. Claassen). 2.9: 'n Vroulike keël van *E. ferox* (Foto dr. M.I. Claassen).





2.10



2.11



2.12

Figure 2.10-2.12 2.10: 'n Plant om die vertakking van die stam van *E. lehmannii* aan te toon (Foto dr. M.I. Claassen). 2.11: 'n Manlike keël van *E. lehmannii* (Foto dr. M.I. Claassen). 2.12: 'n Vroulike keël van *E. lehmannii* (Foto dr. M.I. Claassen).





## VERWYSINGS

- DEHGAN, B & DEHGAN, N.B. 1985. Pollen morphology and taxonomy of Cycadales. *Am. J. Bot.* 72: 949-949.
- GIDDY, C. 1984. Cycads of South Africa. 2<sup>nd</sup> rev. edn. C. Struik, Cape Town.
- JONES, D.L. 1993. Cycads of the world. Reed, Chatswood, Australia.
- KEMP, M. 1985. Focus on *Encephalartos caffer*. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 3: 6-11.
- KEMP, M. 1985. Focus on *Encephalartos lehmannii*. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 4: 12-17.
- KOELEMAN, A., ROBBERTSE, P.J. & EICKER, A. 1981. Die anatomie van die pinnas van die Suid-Afrikaanse spesies van *Encephalartos* Lehm. *Journal S A Botany* 47: 247-271.
- LAVRANOS, J.J. & GOODE, D.L. 1988. Notes on Southern African Cycadales. *Bull. Jard. Bot. Nat. Belg.* 58: 219-224.
- MARSHALL, J., GROBBELAAR, N., COETZEE, J. & OSBORNE, R. 1989. Pollen morphology of the Cycadales with special reference to the *Encephalartos* species. *Pollen et Spores.* 31: 229-249.
- OSBORNE, R. 1987. Focus on *Encephalartos ferox*. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 9: 14-21.
- OSBORNE, R. 1989. Focus on *Encephalartos eugene-maraisii*. *J. Cycad Soc. S. Afr.* 17: 3-13.

# HOOFSTUK 3

## EVALUERING VAN LEWENSKRAGTIGHEID EN KIEMKRAGTIGHEID VAN *ENCEPHALARTOS-* STUIFMEEL

- \* INLEIDING
- \* MATERIAAL EN METODE
- \* RESULTATE EN BESPREKING
- \* SAMEVATTING
- \* FIGUURBLAD
- \* VERWYSINGS





## INLEIDING

Nadat stuifmeel versamel en geberg is, is dit noodsaaklik om vas te stel of die stuifmeel wel nog kan ontkiem en normaal kan groei. Hierdie vasstelling behoort gedoen te word voordat die stuifmeel vir bestuiwing gebruik word. Verskeie tegnieke bestaan om die vasstelling te doen, aangesien lewenskragtigheid en kiemkragtigheid gepaard gaan met die stuifmeelkorrel se selinhoud, die bergingstoestand en 'n kiemingsmedium wat optimale stuifmeelkieming tot gevolg sal hê. Die volgende tegnieke kan gebruik word:

- \* Kleurtegnieke
- \* *In vitro*-ontkieming van die stuifmeel
- \* Werklike bestuiwing van vroulike keëls en die toets van saad vir embriovorming.

In hierdie studie is die eersgenoemde twee tegnieke gebruik.

Die gebruik van 'n vinnige metode om die toestand van kernmateriaal in volwasse stuifmeelkorrels en ontkiemde stuifmeelbuise te bepaal, is van onskatbare waarde vir selbioloë, genetici en fisioloë (Coleman & Goff 1985). Baie kortpadmetodes wat die lewenskragtigheid van stuifmeelkorrels bepaal, is al ontwerp. Van hiërdie is die *in-vitro* ontkiemingstoets en die fluorokromatiese reaksie (FCR) toets die suksesvolste (Heslop-Harrison *et al.* 1984; Shivanna & Heslop-Harrison 1981). Widrechner *et al.* (1983) beskryf egter 'n paar probleme wat ontstaan met gebergde stuifmeel en die gebruik van die FCR-toets. Die FCR-toets gee egter goeie resultate by twee- en driesel stuifmeelkorrels, en word gereeld gebruik om stuifmeel se lewenskragtigheid te bepaal (Shivanna *et al.* 1991).

DNA vorm 'n rooierige pers kompleks tydens die Feulgen-reaksie met Schiff se reagens. O'Brien en McCully (1981) meld om 'n goeie Feulgen-reaksie te kan kry, moet eers 'n

optimum hidrolisetyd bepaal word. Hierdie optimale hidrolisetyd hang af van die soort weefsel, hoe die weefsel fikseer is en van die dikte van die sneë. Die basis van hierdie soort reaksie is toets en tref. Volgens Coleman & Goff (1985) is die Feulgen-reaksie langdradig en kleur verskeie soorte materiale asook DNA by baie plantsoorte. 'n Meer suksesvolle kontrastering van stuifmeelsmere word deur asetoorseientipe kleuring verkry. Kleuring van nie-geaborteerde stuifmeelkorrels se kernmateriaal word oor die algemeen met asetokarmyn in gliseroljellie en "Cotton Blue" in laktofenol gekleur (Alexander 1969). Een nadeel, van bogenoemde kleuring is dat dit nie die geaborteerde stuifmeelkorrels kleur nie (Alexander 1969). As gevolg van hierdie nadeel ontwikkel Alexander in 1969 'n kleurstof wat vir differensiële kleuring van geaborteerde en nie-geaborteerde stuifmeelkorrels gebruik kan word.

In hierdie studie is verskeie chemiese kleurtoetse uitgevoer om nie net die kiemkragtigheid en lewenskragtigheid te toets nie, maar ook om vas te stel wat die chemiese samestelling van die stuifmeelkorrel is.

*In vitro*-ontkiemingstoetse kan 'n aanduiding gee van die lewenskragtigheid van die stuifmeel, maar dikwels stop die groei van die stuifmeelbuis nog voordat dit die lengte bereik wat dit normaalweg in die styl verkry (Stanley & Linskens, 1974). Selfs die tempo waarteen die stuifmeelbuis *in vitro* groei is dikwels stadiger as *in vivo*. Hierdie tendens impliseer dat die optimale groeitoestande ontbreek.

Faktore wat *in vitro* groei beïnvloed, sluit die spesifieke soort stuifmeel, die tyd wanneer die stuifmeel versamel is, die seisoen van die jaar, die metode van versameling en die opbergingsgeskiedenis in (Stanley & Linskens 1974).



Interspesifieke variasie moenie buite rekening gelaat word wanneer 'n monster geneem word van groot hoeveelhede stuifmeel vir lewenskragtige *in vitro*-toetsing nie (Potts & Marsden-Smedley 1989),

Verskillende chemiese en fisiese faktore is bekend wat 'n invloed op optimale *in vitro*-ontkieming van stuifmeel het (Demeke & Hughes 1991). Sommige chemiese stowwe stimuleer ontkieming byvoorbeeld boorsuur, magnesium, kalium en kalsium (Stanley & Linskens 1974). Soortgelyke of ooreenstemmende stowwe kom waarskynlik in die stylweefsel of stempelvloeistof, waarin die stuifmeel *in vivo* outkiem, voor (Stanley & Linskens 1974). Variasie in kiemingsmediums is deur Brewbaker en Kwack (1963) ontwikkel en word algemeen gebruik in die ontkieming van stuifmeel by verskillende spesies. Volgens Potts & Marsden-Smedley (1989) speel sukrose 'n groter rol as boorsuur in die kiemingsmedium by *Eucalyptus*-stuifmeel, maar boorsuur toon 'n moontlike chemotropiese reaksie van stuifmeelbuise volgens Robbertse *et al.* (1990). Koringstuifmeel kiem beter op raffinose of maltose en kieming geskied nie op 'n kiemingsmedium wat sukrose bevat nie (Cheng & McComb 1992).

Die doel van hierdie studie was dus om 'n kiemingsmedium te vind, wat optimale, vinnige en herhaalbare resultate tydens *in vitro*-kiemingstoetse met *Encephalartos*-stuifmeel lewer en wat ondersteun kan word deur kleuringsreaksies.

## **Materiaal en Metode**

Tabel 3.1 dui die stuifmeel aan van *Encephalartos*-spp. wat vir *in vitro*-kiemingstoetse gebruik is. Stuifmeel van *E. ferox* is ook vir kleurtoetse gebruik. Hierdie stuifmeel is uit die Manie van der Schijff Botaniese Tuin van die Universiteit van Pretoria, versamel.



Volwasse manlike keëls is van die plant verwyder, pas nadat die eerste sporangiums oopgebreek het. Nadat die keëls afgesny is, is hulle op skoon velle bruinpapier in die laboratorium geplaas sodat die stuifmeel tydens vrystelling daarop kan versamel.

Versamelde stuifmeel is gesif om sporangiumwande en ander growwe materiaal te verwyder. Die stuifmeel is in digsluitende glashouers geplaas. Houers met stuifmeel is by 5° C en heersende relatiewe humiditeit geberg.

### **Kleurtegnieke / Histochemiese toetse**

Ondergenoemde kleurtoetse is tydens die studie aangewend:

#### **1) Kontrastering met asetokarmyn**

Om kontrastering van gekiemde stuifmeelkorrels te verbeter vir die gebruik van die projeksieligmikroskoop, is die materiaal met asetokarmyn gekleur.

Die volgende kleurtoetse is veral geskik vir die onderskeid tussen geaborteerde en nie-geaborteerde stuifmeelkorrels.

#### **2) Kleuring van gearborteerde en nie-gearborteerde stuifmeelkorrels:**

(Alexander 1969; Heslop-Harrison *et al.* 1984)

Stuifmeelkorrels is direk in 'n druppel van Alexander se kleurstof op 'n voorwerpglasie geplaas en bedek met 'n dekglasie. In die kleurstofmengsel is 4% ysasynsuur gebruik om beter kleur resultate te verkry. Die voorwerpglasie met 'n druppel kleurstof en stuifmeel is vir 24 tot 48 uur op 'n warmplaat (35° C) gelaat. Na dié tydperk verloop het, is die stuifmeelkorrels met behulp van 'n ligmikroskoop bestudeer. 'n Duidelik groengekleurde wand met 'n duidelik rooigekleurde inhoud dui op nie-geaborteerde stuifmeelkorrels.

### **3) DAPI-toets, (4,6 Diamino-2-fenielindool):** (Coleman & Goff 1985).

Stuifmeelkorrels is eers deur middel van die hangdruppelmetode (Stanley & Linskens 1974) ontkiem. 'n Waterige ontkiemingsmedium wat bestaan uit 5%, 10% of 15% sukrose tesame met 0,005% boorsuur, is saam met die kleurstof DAPI gebruik om die lewenskragtige stuifmeelkorrels te kleur. Kleurstofkonsentrasies wat wissel tussen 0,25 tot 5,0 $\mu$ g/ml is in die waterige ontkiemingsmedium gevoeg. Waarnemings is met behulp van 'n fluoressensiemikroskoop (Nikon Optiphot ligmikroskoop toegerus met epifluoresente optika met 450 nm - 490 nm B-2A "excitation" filter en 'n 520 nm "barrier" filter) gemaak.

### **4) Fluorochromatiese (FCR) toets:** (Heslop-Harrison & Heslop-Harrison 1970, Heslop-Harrison *et al.* 1984).

Tien mg fluoressien diasetaat is in 5 ml asetoon opgelos. Die oplossing is op 'n voorwerpglasie druppel vir druppel by 'n paar mikroliter van 'n 10% sukrose-oplossing gevoeg. Stuifmeelkorrels is vir 'n kort rukkie in die medium gelaat. Hierna is die stuifmeelkorrels en medium bedek met 'n dekglasie. Die preparaat is met behulp van 'n fluoressensiemikroskoop met blou filters ondersoek. Waarnemings moet binne 10 minute gemaak word, anders vervaag die fluoressensie. Die lewenskragtigheid van stuifmeel gaan gou verlore in die medium.

Om te toets vir sekere chemiese stowwe in die stuifmeelkorrel self, is semi-dun sneë gemaak en op verskeie maniere behandel. Vir die voorbereiding van semi-dun snitte, is die stuifmeel in 2,5% glutaaraldehyd in 'n 0,1M kakodilaatbuffer en 0,5 % kafeïen (Mueller & Greenwood 1978) gefikseer. Daarna is dit gedehidreer en ingebed in glikolmetakrilaat (GMA) volgens Feder & O'Brien (1968). Die monomeer-mengsel wat gebruik is, is volgens Von Teichman & Robbertse (1981). GMA-sneë, 1-2  $\mu$ m dik, is op 'n Reichert OM U3 ultramikrotroom, met glasmesse gesny. Sneë is soos volg gekleur:



## 5) Toets vir stysel

Die perjodiumsuur-Schiff se reaksie (PAS) volgens Feder & O'Brien (1968) is op sekere sneë uitgevoer. 0,5% 2,4-dinitrofenielhidrasien (DNPH) in 15% asynsuur (vir 30 minute) is as blokkeringsreagens vir onspesifieke aldehydegroepe gebruik. Vir die doel van mikrofotografie is dié sneë met 0,5% toluïdienblou O in bensoaatbuffer by 'n pH van 4,4 vir 1 tot 5 minute, gekontrasteer (Sidman *et al.* 1961).

## 6) Toets vir lipiede

Versadigde Soedanswart B in 70% etanol is vir 10 minute op die sneë gelaat. Die sneë is met 70% etanol gespoel en daarna in vloeibare gliserienjellie gemonteer.

## 7) Toets vir proteïene

Sneë is gekleur met amido-swart 10B (Bullock *et al.* 1980).

## *In vitro* kiemingstoetse

*In vitro*-kiemingstoetse, volgens die hangdruppelmetode van Stanley & Linskens (1974) is op die vars stuifmeel van *E. caffer* (1986) en *E. ferox* (1986) uitgevoer. Om 'n geskikte kiemingsmedium te vind, is daar met verskillende konsentrasies van sukrose en boorsuur geëksperimenteer. Sukrosekonsentrasies van 0%; 3%; 5%; 15% en boorsuurkonsentrasies van 0,005%; 0,05% of 0,1%, opgelos in gedistilleerde water, is gebruik (Bylaag 3.1).

Stuifmeelkorrels is vir 48 uur by 28° geïnkubeer. Aanvanklik is ontkiemde en nie-ontkiemde stuifmeelkorrels in agt gesigsvelde (twee hangdruppels per spesie) van die projeksiemikroskoop getel. Stuifmeel is as gekiem beskou, indien die stuifmeelbuis se lengte twee keer die deursnee van die stuifmeelkorrel was. Die aantal gekiemde stuifmeelkorrels is as 'n persentasie van die totale aantal getelde stuifmeelkorrels per veld uitgedruk. Elke



gesigsveld is as 'n herhaling beskou, aangesien nie minder as 30 stuifmeelkorrels telkens per veld getel is nie.

**Tabel 3.1** Besonderhede van versamelde *Encephalartos*-stuifmeel en datums waarop *in vitro*-ontkiemingstoetse op die stuifmeel uitgevoer is

Spesie	Datum Versamel	<i>In vitro</i> -kiemingstoets uitgevoer	Tydsverloop in dae
<i>E. caffer</i>	1986-02-19	1986-02-21	± 2
<i>E. ferox</i>	1986-02-25	1986-02-28	± 3
	1989-05-15	1992-09-28	± 1228
	1991-04-15	1992-09-28	± 528
<i>E. lehmannii</i>	1992-03-04	1992-09-28	± 204
	1989-05-15	1992-09-28	± 1228
	1991-04-15	1992-09-28	± 528
	1992-05-04	1992-09-28	± 144

Om die *in vitro*-kiemingstoets verder te verfyn is 0,005 gram stuifmeel in 10 milliliter ontkiemingsmedium gesuspendeer om 'n homogene verspreiding van die stuifmeel in die kiemingsmedium te verkry. 'n Submonster van 50 µl hiervan is gebruik om die hangdruppel metode uit te voer. Soortgelyke toetse is deur Mitra (1989) gedoen. Hy het die stuifmeel egter eers oor die voorwerp glasie gestuif en daarna een of twee druppels gedistilleerde water bygevoeg, waarna die stuifmeel met die stomp kant van 'n dissekteernaald in die water versprei is. Uit vier keer honderd stuifmeelkorrels is ontkiemde en nie-ontkiemde korrels afsonderlik getel (Bylaag 3.1).

Die resultate is statisties verwerk deur personeel van STATOMET, Departement Statistiek, Universiteit van Pretoria en die Landbounavorsingsraad- Biometrie Eenheid. Ter aanvulling van die gewone ANOVA (variansie-analise) is die eksploratiewe prosedure genaamd Xaid wat ontwikkel is deur C. Heyman in 1981 van die WNNR ook gebruik (Bylaag 3.2).

## **RESULTATE EN BESPREKING**

### **Kleurtegnieke / Histochemiese toetse**

#### **1) Kontrastering met asetokarmyn**

Kleuring met asetokarmyn het telkens uitstekende resultate verskaf deurdat dié kleurstof die stuifmeelkorrels duidelik kontrasteer. Kernmateriaal van die stuifmeelkorrel, of dit kiem al dan nie, kleur duidelik rooi (Kearns & Inouye 1992). Met hierdie studie is die kernmateriaal duidelik waargeneem met behulp van 'n projeksieligmikroskoop (Figuur 3.1).

#### **2) Kleuring van geaborteerde en nie-geaborteerde stuifmeelkorrels**

By die *Encephalartos ferox*-stuifmeel wat ondersoek is, is daar in verskillende maande lae kiemingspersentasies verkry. Die gebruik van Alexander se kleurstof was 'n moontlike oplossing om die persentasie geaborteerde stuifmeelkorrels van die nie-geaborteerde stuifmeelkorrels te onderskei en sodoende 'n bepaling te maak van die lae kiemingspersentasies. Volgens Alexander (1969) kleur geaborteerde stuifmeelkorrels groen terwyl nie-geaborteerde stuifmeelkorrels rooi kleur. Baie goeie resultate is met die kleurstof behaal in die sin dat nie-geaborteerde stuifmeelkorrels se inhoud duidelik rooierig kleur met Alexander se kleurstof (Figuur 3.2). Die aangepaste ysasynsuur konsentrasie lewer dus goeie resultate by die kleurtoets. Verdere studie om die verband tussen kiemingspersentasie van die stuifmeelkorrels en die gebruik van Alexander se kleurstof vas te stel is egter nodig.



### 3) DAPI-toets

Hierdie kleurtoets is 'n vinnige manier om die kernmateriaal van 'n volwasse stuifmeelkorrel te ondersoek en uitslag te kan gee of die stuifmeelkorrel lewenskragtig is al dan nie. Volgens Coleman & Goff (1985) kan die kleurstof in die kiemingsmedium geïnkorporeer word. 'n Positiewe resultaat is wanneer die kern lig kleur. Die kiemingstydperk in die geval van *Encephalartos*-stuifmeel is 48 uur en die kleuring van *Encephalartos*-stuifmeel was nie altyd suksesvol nie, aangesien fluoressensie met tyd verlore gaan. Die wand van die stuifmeelkorrel was dikwels al wat fluoressieer het en dit wil voorkom asof dié stof óf te lank neem om in te dring in die stuifmeelkorrel in óf dat die metode om die vitaliteitskleurstof in die kiemingsmedium in te sluit nie voldoende is nie. Indien die vitaliteitskleurstof direk op die stuifmeelkorrels geplaas is het die kernmateriaal lig onder die fluoressensiemikroskoop vertoon (Figuur 3.3).

### 4) Fluorochromatiese (FCR) toets

Hierdie toets het geen positiewe resultate gelever nie, aangesien fluoressensie te vinnig tot niet gegaan het. Dié toets gee lewenskragtigheid van stuifmeel weer deur die plasmalemma van die vegetatiewe sel te evalueer deur vir die teenwoordigheid en aktiwiteit van verskeie esterase ensieme te toets (Shivanna & Heslop-Harrison 1981). Aktiewe esterase ensieme wat met 'n volledige funksionele selmembraan geassosieer word, hidroliseer die fluoressien diasetaat ioon en laat die ioon by ultraviolet golflengtes fluoressieer. Volgens Shivanna en Heslop-Harrison (1981) is daar in die algemeen 'n hoogs betekenisvolle korrelasie tussen fluoressensie (FCR) en die ontkieming van stuifmeelkorrels. In hierdie studie is dit egter nie verkry nie. Die gemodifiseerde samestelling van die kleurstof (Gwyn & Stelly 1989) wat op die oorspronklike FCR-toets gebaseer is, kan moontlik ook 'n oplossing bied vir die swak resultate verkry van die toetse soos in hierdie verhandeling gedoen is. Verdere toetse in dié verband moet uitgevoer word.



## 5) Toets vir stysel

Die PAS-toets kleur stysel en selwand polisakkariede rooi; kallose en sellulose bly ongekleurd. Die kontrastering met toluïdienblou kleur RNA pers; DNA blou tot blougroen, pektiensure rooi of rooipers; polifenole en lignien groen of blougroen. Die reaksie van die stuifmeelkorrels met toluïdienblou in bensoaatbuffer saam met PAS blyk duidelik in Figuur 3.4. Moontlik is die baie rooigekeurde gedeeltes pektiensure en die blou, korrelrige gedeeltes die DNA. Adinolfi *et al.* 1991 beskryf in sy studies 'n suuragtige polisakkaried in *E. frederici guilielmi*. Dieselfde soort studie is nog nie op *E. ferox*-stuifmeel uitgevoer nie maar soortgelyke polisakkariede is ook in *E. ferox*-stuifmeel moontlik teenwoordig.

## 6) Toets vir lipiede

Soedanswart kleur lipiede swart. Figuur 3.5 dui aan dat die inhoud van die stuifmeelkorrels ongekleurd is, terwyl die wande van die stuifmeelkorrels wel swart vertoon. 'n Lipiedagtige substans in die wand van die stuifmeelkorrel is dus moontlik teenwoordig.

## 7) Toets vir proteïene

Die inhoud van die stuifmeelkorrel kleur blou en die kernmateriaal kleur amper swart- blou tot donkerblou. Wande vertoon bykans swart (Figuur 3.6). Dit wil voorkom of proteïene wel teenwoordig is.

## *In vitro*-kiemingstoetse

Die rou data, bestaande uit minimum en maksimum persentasie kieming, aantal observasies, standaardafwyking van die aantal observasies asook die spesie, jaar waarin stuifmel versamel is en die konsentrasies sukrose en boorsuur, word in Bylaag 3.1 weergegee. Die 0% sukrosebehandeling het in geen van die eksperimente positiewe resultate opgelewer nie en is dus uit die analise gelaat. Tabel 3.2 dui die statistiese verwerking van die kiemings=

persentasies vir *E. caffer*- en *E. ferox*-stuifmeel (1986) aan. Die verskillende kombinasies van veranderlikes word ook in Tabel 3.2 weergegee. Aangesien die persentasies kieming tussen 0% en 80% lê, is die data met die booghoektransformasie getransformeer.

Ss % is die persentasie variasie en verklaar elke effek relatief tot die totale variasie. Wanneer die ss% kleiner as 5% is, is die bydrae van die komponent onbelangrik en kan aan toeval toe te skryf wees. Die resultate toon dat sukrose-, en boorsuurkonsentrasie in die kiemingsmedium wel van belang is. Sukrose-boorsuur interaksie se ss% is  $\pm 20\%$ . Dit dui daarop dat hierdie faktore belangrike komponente van die kiemingsmedium uitmaak en dat 'n geskikte kiemingsmedium nie daarsonder kan klaarkom nie (Shivanna & Johri 1985). Die ouderdom van *Encephalartos*-stuifmeel in hierdie geval speel nie 'n rol nie aangesien dit hoofsaaklik vars stuifmeel is wat gebruik is in die *in vitro* kiemingstoets.

Stuifmeel versamel in die jare 1989, 1991 en 1992 se optimale kiemingsmedium sluit 0,005% boorsuur en 5% sukrose in. Hierdie stuifmeel wat al "oud" is, is getoets om seker te maak of ontkieming van stuifmeel wel nog kan plaasvind in eersgenoemde kiemingsmedium.



**Tabel 3.2** Getransformeerde waardes van die kiemingspersentasies deur die Variansie-analisemetode. v.g.-vryheidgraad, sk-som van kwadrate, gsk-gemiddelde som van kwadrate, F-F-toets van die behandelingseffek, F wh (P)- oorskrydingswaarskynlikheid, ss%-persentasie variasie verklaar relatief tot die totale, n.s.-nie betekenisvol verskillend nie.

Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F wh (P)	ss %
<b>Sukrose (Su)</b>	1	2851,10	2851,10	206,69	< 0,001	± 10
<b>Boorsuur (Boor)</b>	2	3865,45	1932,73	140,11	< 0,001	< 10
<b>Spesie (Sp)</b>	1	181,50	181,50	13,16	< 0,001	> 10
<b>Ouderdom (Oud)</b>	2	6227,64	3113,82	225,74	< 0,001	< 5
<b>Su.Boor</b>	2	37,00	18,50	1,34	n.s.	± 20
<b>Su.Sp</b>	1	0,00	0,00	0,00	n.s.	< 5
<b>Boor.Sp</b>	2	261,54	130,77	9,48	< 0,001	< 5
<b>Su.Oud</b>	2	938,15	469,08	34,01	< 0,001	< 5
<b>Boor.Oud</b>	4	487,50	121,88	8,84	< 0,001	< 5
<b>Sp.Oud</b>	2	33,66	16,83	1,22	n.s.	< 5
<b>Su.Boor.Sp</b>	2	136,89	68,44	4,96	0,01<P< 0,05	< 5
<b>Su.Boor.Oud</b>	4	832,53	208,13	15,09	< 0,001	< 5
<b>Su.Sp.Oud</b>	2	101,21	50,61	3,67	0,01<P< 0,05	< 5
<b>Boor.Sp.Oud</b>	4	11723,88	2930,97	212,48	< 0,001	±40
<b>Su.Boor</b>	4	950,11	237,53	17,22	< 0,001	< 5
<b>Residu</b>	108	1489,75	13,79			
<b>Totaal</b>	143	30117,91				

Na hierdie bevindings is daar besluit om telkens drie kiemingsmediums naamlik,

a) 5% sukrose en 0,005 % boorsuur, b) 10% sukrose en 0,005% boorsuur en c) 15% sukrose en 0,005% boorsuur opgelos in gedistilleerde water te gebruik. Hierdie navorsing resultate word in hoofstuk vier bespreek.

## SAMEVATTING

Met aanpassing van die ysasynsuur se hoeveelhede het Alexander se kleurstof 'n baie goeie aanduiding gegee of die stuifmeelkorrels geaborteer is al dan nie. Verdere verfynde toetse kan 'n korrelasie tussen geaborteerde stuifmeelkorrels en nie-geaborteerde stuifmeelkorrels aantoon. Selfs met DAPI se toets kan die fluoresserende kerne wel waargeneem word. Hierdie fluoressering dui op lewenskragtige stuifmeel. Indien die kleurstofkonsentrasie van DAPI in die hangdruppelmetode verfyn kan word kan hierdie toets gebruik word om dadelik vas te stel hoeveel geaborteerde en nie-geaborteerde by *Encephalartos*-stuifmeel teenwoordig is. So kan 'n vinnige beraming gemaak word of die stuifmeel wel gebruik kan word vir verdere ontkiemingstoetse of handbestuiwing van die vroulike keëls wel kan voortgaan.

Die toetse om stysel, lipiede en proteïene het ook resultate opgelewer wat nie duidelik uitspraak lewer of die stowwe teenwoordig is al dan nie. Duidelike vinnige toetse om gou te bepaal wat die chemiese inhoud van die stuifmeelkorrel is, kan baie handig wees, maar hierdie toetse sal verfyn moet word vir *Encephalartos*-stuifmeel om sodoende die regte toets vir die regte histochemiese stof daar te stel.

Die bepaalde kiemingsmedium soos getoets in hierdie hoofstuk dui daarop dat lae sukrosekonsentrasies nie altyd geskik is in 'n kiemingsmedium om *Encephalartos*-stuifmeel

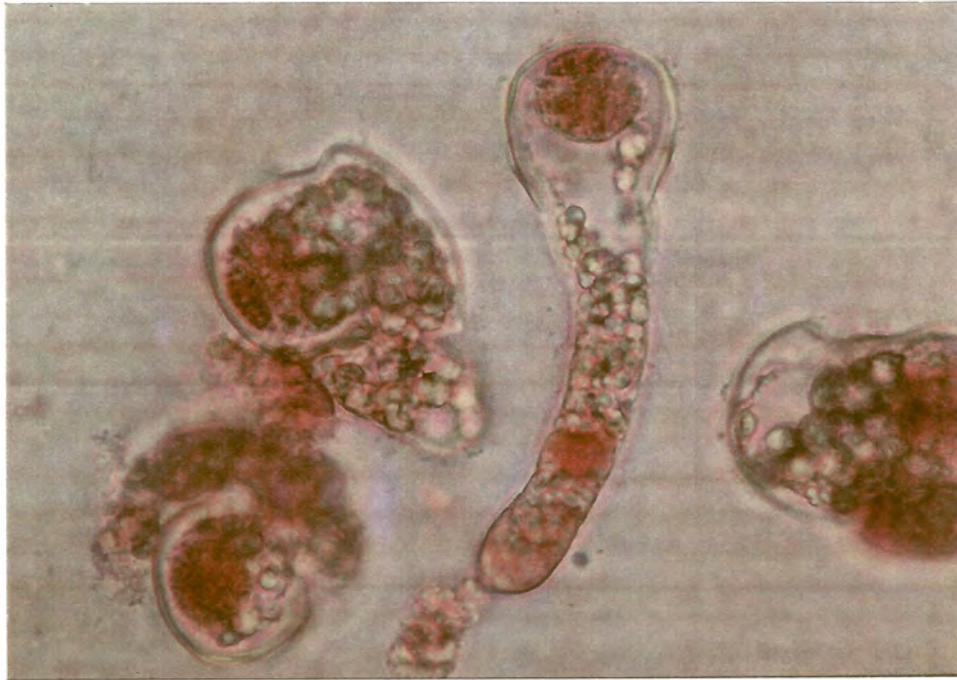


in te ontkiem nie. Hoër sukrosekonsentrasies in die kiemingsmedium kan moontlik aan die inherente behoeftes van die stuifmeel voorsien aangesien verskillende spesies se stuifmeel spesifieke behoeftes het (Demeke & Hughes 1991). Laasgenoemde outeurs noem dat die inherente behoeftes van die stuifmeel wel verskil van jaar tot jaar en van spesie tot spesie. Die aanbeveling van die volgende kiemingsmedium vloei direk uit hierdie tendens, naamlik 5%, 10% en 15% sukrose in water afsonderlik opgelos met 'n 0,005% boorsuur in elke oplossing. Hierdie sukrosekonsentrasies dek 'n wye spektrum van behoeftes wat die stuifmeelkorrel inherent kan besit.

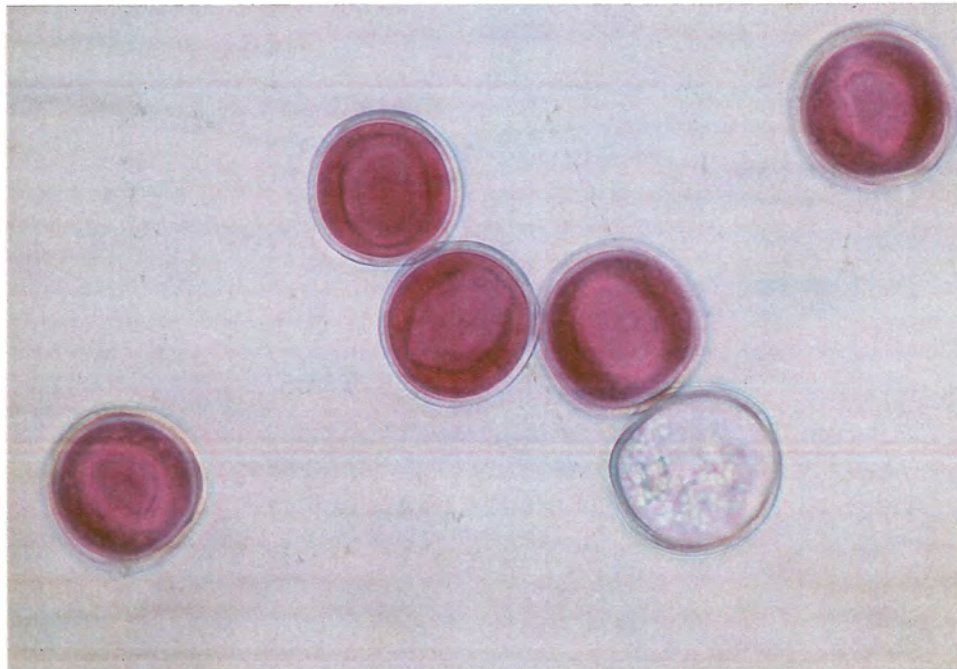


# FIGUURBLAD





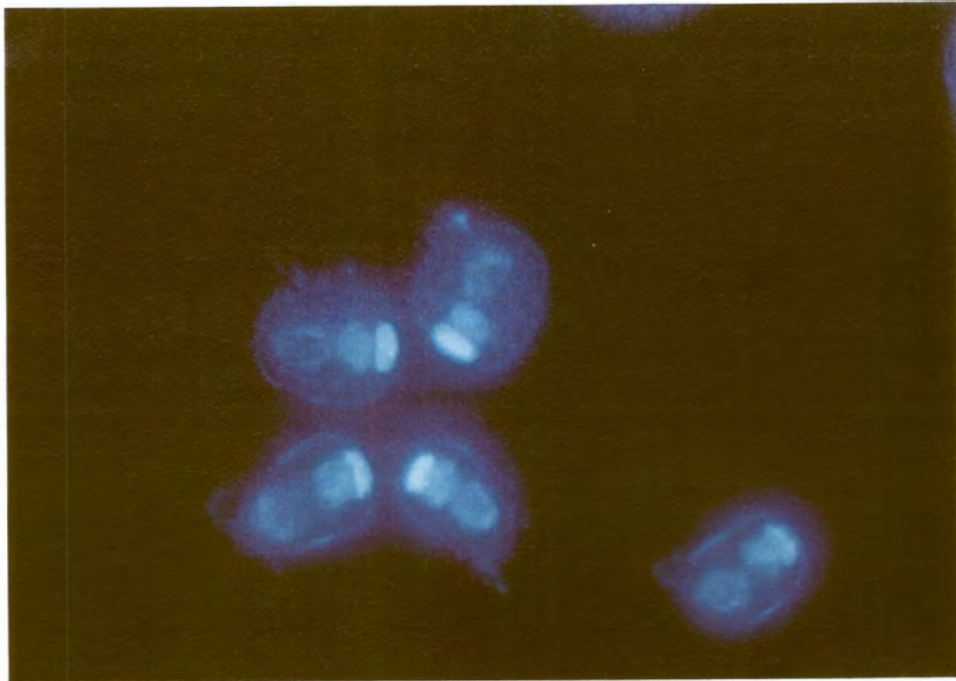
3.1



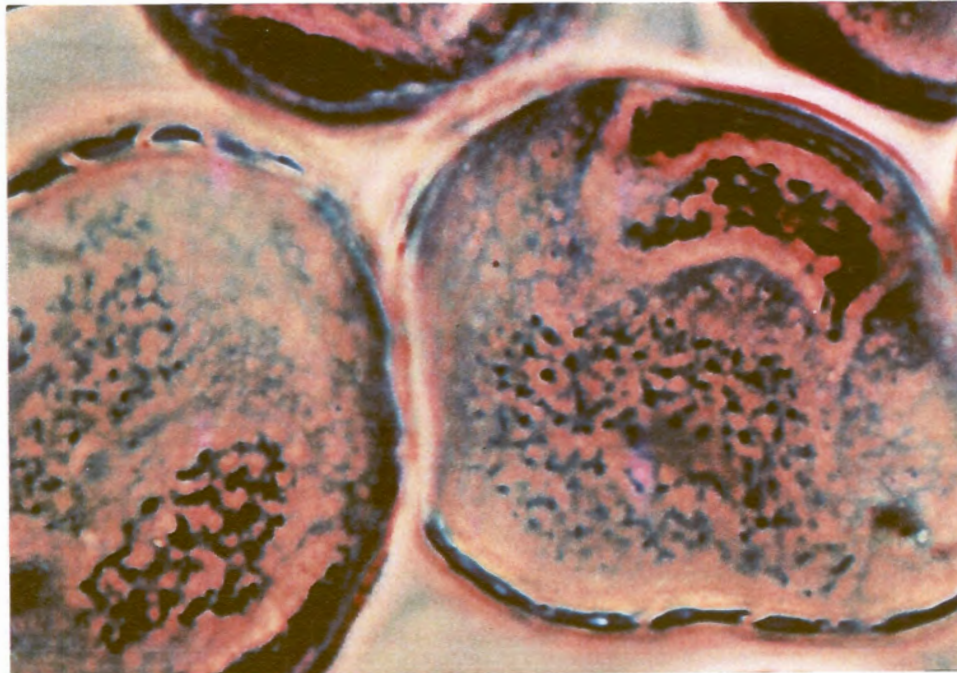
3.2

**Figuur 3.1, 3.2** 3.1: Stuifmeelkorrels van *E. ferox* wat met asetokarmyn gekleur is. Kernmateriaal is duidelik waarneembaar. Ontkiemde sowel as nie-ontkiemde stuifmeelkorrels se kerninhoud kleur.  $\times 400$ . 3.2: *Encephalartos ferox*-stuifmeel wat met Alexander se kleurstof gekleur is. Arboteerde stuifmeelkorrels kleur lig. Nie-arboteerde stuifmeelkorrels kleur rooi.  $\times 400$ .

3.3



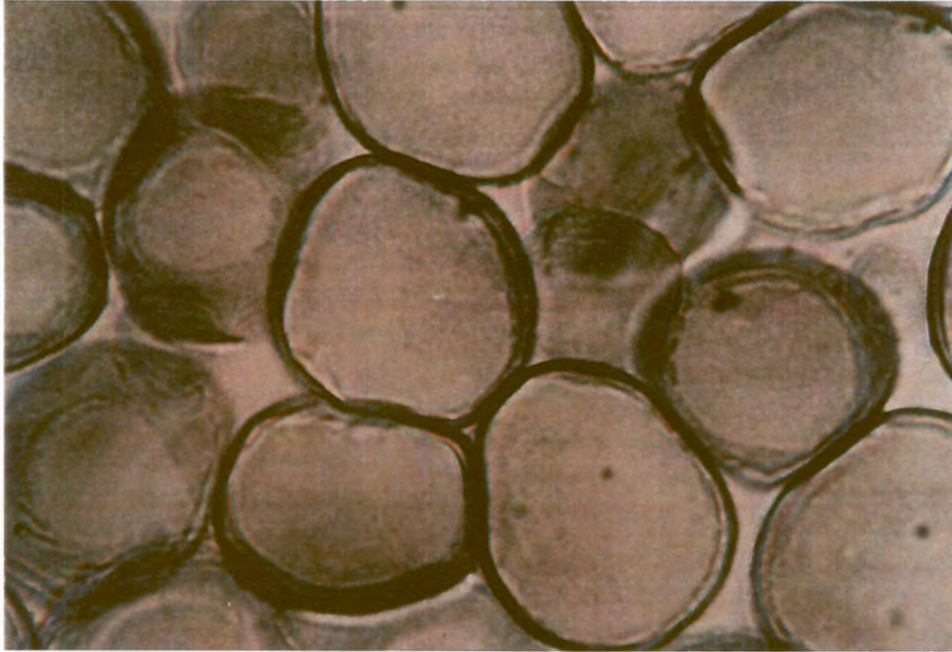
3.4



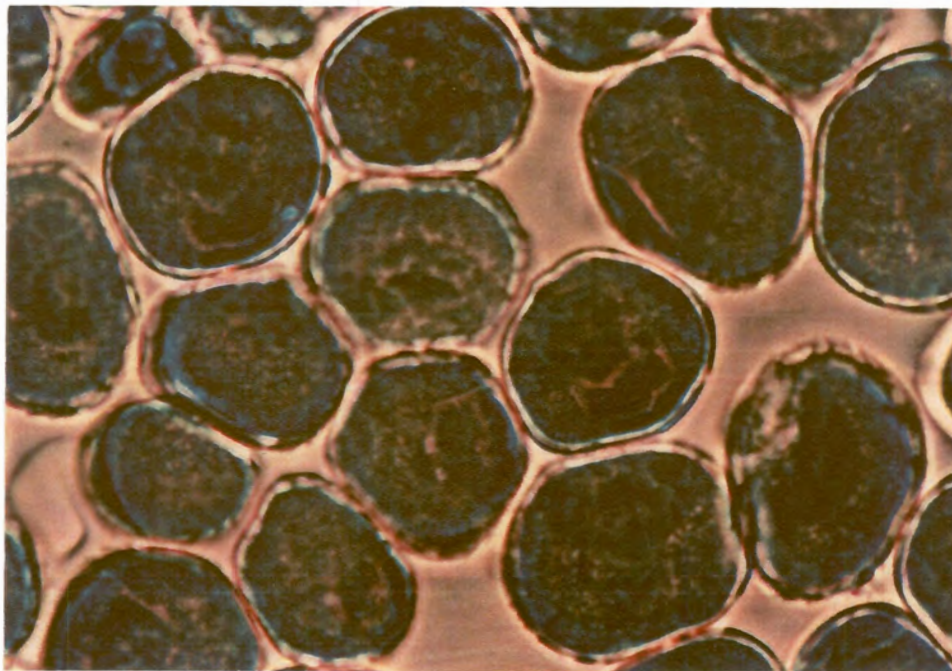
**Figuur 3.3, 3.4** 3.3: Stuiwneelkorrels van *E. ferox* gekleur met die vitaliteitskleurstof, DAPI.  $\times 100$ . Die fluoresserende kerne toon aan dat dié stuiwneelkorrels wel lewenskragtig is. 3.4: Stuiwneel van *E. ferox* wat met Toluidienblou en PAS reaksie gekleur is. Moontlik is die rooigekleurde gedeeltes pektiensure en die blougekleurde korrelrige strukture, kernmateriaal. Die wande wat duidelik blou kleur is 'n moontlike reaksie op die Toluidienblou kontrastering.  $\times 400$ .



3.5



3.6



**Figuur 3.5, 3.6** 3.5: Stuifmeelkorrels van *E. ferox* wat met Soedanswart B gekleur is. Selinhoud is ongekleurd maar die swartgekleurde wand dui op 'n lipiedbevattende substans.  $\times 250$ . 3.6: *Encephalartos*-stuifmeel wat met Amidoswart gekleur is. Die wand kleur swartblou, die inhoud wat uit proteïene bestaan, kleur blou en die kernmateriaal kleur donkerblou tot bruin.  $\times 200$ .

## VERWYSINGS

- ADINOLFI, M., CORSARO, M.M., MANGONI, L. & PARRILLI, M. 1991. Studies of an acidic polysaccharide from *Encephalartos friderici quilielmi*. *Carbohydrate Res.* 222: 215-221.
- ALEXANDER, M.P. 1969. Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* 44: 117-122.
- BREWBAKER, J.L. & KWACK, B.H. 1963. The essential role of calcium in pollen tube growth. *Am. J. Bot.* 50: 859-865.
- BULLOCK, S., ASHFORD, A.E. & WILLETS, H.J. 1980. The structure and histochemistry of sclerotia of *Sclerotinia minor* Jagger II. Histochemistry of extracellular substances and cytoplasmic reserves. *Protoplasma* 104: 333-351.
- CHENG, C. & McCOMB, J.A. 1992. *In vitro* germination of wheat pollen on raffinose medium. *New Phytol.* 120: 459-462.
- COLEMAN, A.W. & GOFF, L.J. 1985. Applications of fluorochromes to pollen biology. I. Mithramycin and 4',6-Diamino-2-Phenylindole (DAPI) as vital stains and for quantitation of nuclear DNA. *Stain Technol.* 60: 145-154.
- DEMEKE, T. & HUGHES, H.G. 1991. Germination and storage of pollen of *Phytolacca dodecandra* L. (endod). *Ann Bot.* 68: 13-15.
- FEDER, N. & O'BRIEN, T.P. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. *Am. J. Bot.* 55: 123-142.
- GWYN, J.J. & STELLY, D.M. 1989. Method to evaluate pollen viability of upland cotton: Tests with chromosome translocations. *Crop. Sci.* 29: 1165-1169.
- HESLOP-HARRISON, J. & HESLOP-HARRISON, Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol.* 45:115-120.



- HESLOP-HARRISON, J., HESLOP-HARRISON, Y & SHIVANNA, K.R. 1984. The evaluation of pollen quality, and further appraisal of fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Gen.* 67: 367-375.
- KEARNS, C.A. & INOUYE, D.W. 1992. Techniques for Pollination Biologists. University Press of Colorado, Colorado.
- MITRA, G.C. 1989. A simple technique for pollen viability test. *Current Sc.* 58: 1150-1151.
- MUELLER, W.C. & GREENWOOD, A.D. 1978. The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. *J. Exp. Bot.* 29: 757-764.
- O'BRIEN, T.P. & McCULLY, M.E. 1981. The Study Of Plant Structure Principles And Selected Methods. Thermarcarphi Pty. Ltd. Melbourne, Australia.
- POTTS, B.M. & MARSDEN-SMEDLEY, J.B. 1989. *In vitro* germination of *Eucalyptus* pollen: response to variation in boric acid and sucrose. *Aust. J. Bot.* 37: 429-441.
- ROBBERTSE, P.J., LOCK, J.J., STOFFBERG, E. & COETZER, L.A. 1990. Effects of boron on directionality of pollen tube growth in *Petunia* and *Agapanthus*. *S. A. J. Bot.* 56: 487-492.
- SHIVANNA, K.R. & HESLOP-HARRISON, J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* 47: 759-770.
- SHIVANNA, K.R., LINSKENS, H.F. & CRESTI, M. 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theor. Appl. Genet.* 81: 38-42.
- SIDMAN, R.L., MOTTLA, P.A. & FEDER, N. 1961. Improved polyester wax embedding for histology. *Stain Technol.* 36: 279-284.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

VON TEICHMAN UND LOGISCHEN, I. & ROBBERTSE, P.J. 1981. The subterranean intermediary organs of *Dioscorea continifolia* Kunth: 2. Anatomy of these organs in comparison with that of a typical root and shoot. *S. Afr. J. Bot.* 47:637-651

WIDRLECHNER, M.P., PELLET, H.M., ASCHER, P.D. & FUHRMAN, S.C. 1983. *In vivo* pollen germination and vital staining in deciduous *Azaleas*. *HortScience* 18: 86-88