

HOOFSTUK 4

**DIE KIEMINGSGEDRAG VAN *ENCEPHALARTOS-*
STUIFMEEL IN VERSKILLENDE SUKROSE-
KONSENTRASIES NADAT DIE
STUIFMEEL BY VERSKILLENDE TEMPERATURE
GEBERG IS.**

- * INLEIDING
- * MATERIAAL EN METODE
- * RESULTATE EN BESPREKING
- * SAMEVATTING
- * FIGURE
- * VERWYSINGS



INLEIDING

Soos reeds in hoofstuk een genoem, is die behoud van stuifmeelkiemkragtigheid en -lewenskragtigheid grootliks van die stuifmeelbergingswyses afhanklik (Stanley & Linskens 1974). Verslae oor die berging en vervoer van dadelpalmstuifmeel is van die oudste verslae bekend oor stuifmeel lewenskragtigheid. Die manlike blomme van *Phoenix dactylifera* is duidelik genoem in handelskontrakte in die Hammurabi periode omtrent 2000 v.C (Stanley & Linskens 1974). Waar daar aanvanklik gedink is dat berging van manlike blomme in donker, droë plekke die kiemkragtigheid en lewenskragtigheid verleng, gaan die twee eienskappe egter verlore met veroudering (Stanley & Linskens 1974).

Kritiese eksterne faktore sluit relatiewe humiditeit (RH), temperatuur en die atmosfeer wat die stuifmeel omring in. Resultate oor die lewenskragtigheid van stuifmeel van ongeveer 80 spesies, wat geberg is by lae humiditeite, is in die laat 19 de vroeë 20 ste eeu bekend gemaak (Stanley & Linskens 1974).

Stuifmeel van sommige spesies byvoorbeeld *Betula verrucosa* kan tot 920 dae by 5° C en 0% heersende relatiewe humiditeit (RH) geberg word (Stanley & Linskens 1974) en nog 'n kiemingspersentasie van 20% lower. Ander spesies soos *Ginkgo biloba* en *Pinus nigra* wat vir 700 en 920 dae by 5° C geberg is, het na die berging nog 'n kiemingspersentasie van 35% en 20% onderskeidelik gehad (Stanley & Linskens 1974). *Verticordia*-stuifmeel kan egter vir ses maande (180 dae) by kamertemperatuur geberg word en behou 50% kiemkragtigheid (Tyagi *et al.* 1992).

Stuifmeel van *Gossypium hirsutum* L. kan vir 24 uur by 10° C en 15° C by beide hoë en lae humiditeite geberg word (Rodriquez-Garry & Barrow 1986). Uit die verskillende werke kan afgelei word dat stuifmeel by verskillende temperature en relatiewe humiditeite geberg word. Elke spesie het 'n eie optimum bergingstyd, -humiditeit en -temperatuur.

Daar moet egter gewaak word om nie te veralgemeen nie, aangesien die resultate verkry van die berging van verskillende spesies by hul spesifieke optimum RH nie altyd vergelykbaar is nie as gevolg van inherente eienskappe van die stuifmeel self (Stanley & Linskens 1974). Selfs die invloed van berging van stuifmeel by 'n temperatuur van -196° C (berging in vloeibare stikstof) is ondersoek (Maguire & Sedgley 1997, Van der Walt & Littlejohn 1996). Berging van *Zea mays*- L., *Narcissus*- en *Verticordia*-stuifmeel in voorafgenoemde medium, is bekend (Barnabas & Rajki 1976; Bowes 1990; Tyagi *et al.* 1992).

Vriesdroging van verskillende biologiese materiale is al gedoen (Ching & Ching 1964; Davies & Dickinson 1971). Hierdie metode (indien geslaagd by *Encephalartos*-stuifmeel) kan lei tot langtermynberging. Drie faktore is van kardinale belang by vriesdroging, naamlik die oorspronklike voginhoud van die stuifmeelmonster, die duur van vriesdroging en gekontroleerde hidrasie na 'n periode van berging (Shivanna & Johri 1985). Volgens Ching & Ching (1964) vriesdroog dennestuiwmeel (deel van Gymnosperme) beter nadat dit luggedroog is.

Osborne *et al.* (1992) het *Encephalartos*-stuifmeel by heersende (daaglikse wisselende temperatuur), 0° C en -15° C geberg. Twee spesies van die genus *Encephalartos*, naamlik *E. ferox* en *E. transvenosus* is deur Osborne ondersoek. In hiërdie verhandeling is daar by

5° C vier spesies gebruik, naamlik *E. caffer*, *E. eugene-maraisii*, *E. ferox* en *E. lehmannii*. By 'n temperatuur van 25° C is drie spesies gebruik, naamlik *E. caffer*, *E. ferox* en *E. lehmannii*. Al hierdie spesies is by heersende (daaglikse wisseling in humiditeit) RH geberg en die uitwerking van konstante RH by 5° C en 25° C op *Encephalartos*-stuifmeel is ook ondersoek. Volgens Stanley & Linskens (1974) behou die meeste plantspesies se stuifmeel hulle lewenskragtigheid die beste by lae RH.

Die doel van hierdie studie is om die invloed van berging by 5° C (yskas) en 25° C met heersende (wisselende) RH en konstante RH, asook -196° C op die lewenskragtigheid van *Encephalartos*-stuifmeel te bepaal. Vriesdroging kan 'n moontlike alternatief wees vir die berging van *Encephalartos*-stuifmeel. Indien dit moontlik sou wees om die stuifmeel van broodbome vir lang periodes (langer as een jaar) wel onder hierdie toestande te kan berg, sal kwekers en ander liefhebbers makliker stuifmeel kan berg in stuifmeelbanke om self handbestuiwing in hulle tuine of kwekerye toe te pas wanneer die vroulike plante se keëls gereed is vir bestuiwing.

MATERIAAL EN METODE

Vars stuifmeel van die *Encephalartos*-spesies soos in Tabel 4.1 aangetoon, is uit die Manie van der Schijff Botaniese Tuin van die Universiteit van Pretoria versamel. Die besonderhede, soos versameldatum en temperatuur waarby stuifmeel geberg is, word ook in Tabel 4.1 aangetoon. Die stuifmeel van die verskillende spesies is op dieselfde manier soos in Hoofstuk 3 versamel en in digsluitende botteltjies geplaas. Die houers met stuifmeel is by verskillende temperature geberg.

Tabel 4.1 Besonderhede van stuifneelspesies, versameldatum van stuifmeel, temperatuur waarby stuifmeel geberg is, RH en datum van beëindiging van eksperiment. RH-Relatiewe Humiditeit

Spesie	Versameldatum	RH	Einde van eksperiment
5 ° C			
<i>E. caffer</i>	1986-02-19	heersend	1987-09-19
<i>E. ferox</i>	1986-02-25	heersend	1987-09-25
<i>E. lehmannii</i>	1986-04-14	heersend	1987-09-14
<i>E. eugene-maraisii</i>	1987-02-22	heersend	1987-10-22
<i>E. ferox</i>	1987-02-28	heersend	1987-10-28
25° C			
<i>E. caffer</i>	1986-02-19	heersend	1986-11-19
<i>E. ferox</i>	1986-02-25	heersend	1986-11-25
<i>E. lehmannii</i>	1986-04-14	heersend	1986-11-14
5° C			
<i>E. ferox (1986)</i>	1986-02-25	20,40,60,80,90	1986-10-25
<i>E. lehmannii</i>	1986-04-14	20,40,60,80,90	1987-03-14
<i>E. eugene-maraisii</i>	1987-02-19	20,40,60,80,90	1987-10-19
<i>E. ferox (1987)</i>	1987-02-28	20,40,60,80,90	1987-10-28
25 ° C			
<i>E. eugene-maraisii</i>	1987-02-19	20,40,60,80,90	1987-10-19

Tabel 4.1 Vervolg

25 ° C			
<i>E. ferox (1986)</i>	1986-02-25	20,40,60,80,90	1986-10-25
<i>E. lehmannii</i>	1986-04-14	20,40,60,80,90	1987-03-14
<i>E. ferox (1987)</i>	1987-02-28	20,40,60,80,90	1987-10-28
-196 ° C			
<i>E. eugene-maraisii</i>	1987-02-22	_____	1987-10-22
<i>E. ferox</i>	1987-02-28	_____	1987-10-28
Vriesdroging			
5° C en -25° C			
<i>E. eugene-maraisii</i>	1987-02-22	_____	1987-10-22
<i>E. ferox</i>	1987-02-28	_____	1987-10-22

1) 5° C (in yskas)

Skoon stuifmeel van vier *Encephalartos*-spesies is in aparte digsluitende botteltjies by 'n temperatuur van 5° C en heersende RH geberg.

2) 25° C en heersende relatiewe humiditeit

Skoon stuifmeel van drie *Encephalartos*-spesies is in aparte oop en digsluitende botteltjies geplaas. Die oop houers is gebruik om die invloed van heersende humiditeite te monitor. Gemiddelde maandelikse humiditeit in Pretoria vir Januarie 1986 tot Desember 1987 word in Tabel 4.2 weergegee. Digsluitende houers is gebruik om die variërende humiditeite te beperk en 'n meer konstante RH te bewerkstellig. Die houers met stuifmeel is by 'n temperatuur van 25° C (kamertemperatuur) en heersende RH geberg.

TABEL 4.2 GEMIDDELDE MAANDELIKSE HUMIDITEIT VAN DIE ATMOSFEER IN PRETORIA VIR 1986-01-01 TOT 1987-12-31 SOOS VERSKAF DEUR DIE WEERBURO IN PRETORIA

PRETORIA	TYD - 08:00												
JAAR	JAN	FEBR	MRT	APR	MEI	JUN	JUL	AUG	SEPT	OKT	NOV	DES	GEMIDDELD JAARLIKS
1986	71	71	69	77	67	70	64	55	63	67	70	68	67,7
1987	73	68	76	79	68	67	65	65	70	66	70	76	70,3
Gemiddeld maandeliks	72	69	72	75	68	69	64	60	63	66	70	72	68,3

PRETORIA	TYD - 12:00												
JAAR	JAN	FEBR	MRT	APR	MEI	JUN	JUL	AUG	SEPT	OKT	NOV	DES	GEMIDDELD JAARLIKS
1986	44	42	40	44	30	36	31	26	32	42	47	46	38,3
1987	46	42	47	44	28	30	28	35	38	38	49	50	39,6
Gemiddeld maandeliks	45	42	43	44	30	33	30	30	40	40	48	48	39,4

PRETORIA	TYD - 20:00												
JAAR	JAN	FEBR	MRT	APR	MEI	JUN	JUL	AUG	SEPT	OKT	NOV	DES	GEMIDDELD JAARLIKS
1986	64	52	52	61	47	50	43	35	41	52	58	63	51,5
1987	56	53	63	55	45	45	41	43	55	49	67	63	52,9
Gemiddeld maandeliks	55	52	57	58	46	47	42	39	48	51	62	63	51,7

3) 5 ° C en gekontroleerde RH

Skoon stuifmeel is in oop glasbloedbuise in glasbekers geplaas. Die oop glasbuise, met stuifmeel, is by 'n temperatuur van 5° C by gekontroleerde RH in geslote desikkators by die volgende reeks RH 's geberg naamlik, 25%; 43%; 59,5%; 82,5% en 93%. Die RH's is verkry deur die volgende versadigde soutoplossings (onder in geslote desikkators te plaas) naamlik $KC_2H_3O_2$; $ZnNO_3$; $Na_2Cr_2O_7 \cdot H_2O$; $(NH_4)_2SO_4 \cdot 10H_2O$ en $BaCl_2$ (Rockland 1960; Winston & Bates 1960). Vir makliker verwysing sal na die reeks 20%, 40%, 60% 80% en 90% RH verwys word. Die stuifmeel is vir 'n maand ongehinderd in die desikkators gelaat en daarna is telkens een keer per maand een glasbuis met stuifmeel uit die desikkator gehaal en die stuifmeelmonster is vir kiemkragtigheid getoets.

4) 25° C en gekontroleerde RH

Skoon stuifmeel is in glasbloedbuise geplaas. Die oop glasbuise met stuifmeel is in glasbekers in geslote desikkatore by 'n temperatuur van 25° C en gekontroleerde RH geberg. Die volgende reeks RH is by 25° C opgestel:

22,5%; 43%; 57,5%; 80% en 90% en is verkry deur die volgende versadigde soutoplossings (onder in geslote desikkatore te plaas), naamlik $KC_2H_3O_2$; $K_2CO_3 \cdot 2H_2O$; $NaBr \cdot 2H_2O$; $(NH_4)_2 \cdot SO_4$ en $BaCl_2$ (Rockland 1960; Winston & Bates 1960). Weereens sal daar na die reeks 20%, 40%, 60%, 80%, 90% RH telkens verwys word.

5) -196° C (in vloeibare stikstof)

Skoon stuifmeel van twee *Encephalartos*-spesies is in strooitjies wat aan die eenkant geslote is geplaas waarna die strooitjies met stuifmeel in die vloeibare stikstof gedompel is. Maandeliks is een strooitjie van elke spesie uit die vloeibare stikstof gehaal en in 'n waterbad by 32° C vir 15-20 minute ontvries en gehidreer. Daarna is die kiemkragtigheid van elke monster getoets.

6) Vriesdroging

Vars versamelde stuifmeel is in digsluitende botteltjies geplaas waarna dit deur die personeel van die Departement Biochemie, Universiteit van Pretoria, op die standaardmanier gevriesdroog is. Die gevriesdroogde stuifmeel is daarna by 5° C (yskas) en -25° C (vrieskas) geberg. 'n Monster van elke behandeling is maandeliks geneem. Stuifmeelmonsters van elke spesie is in 'n waterbad by 32° C vir 15-20 minute ontvries en gehidreer.

In vitro kiemingstoetse volgens die hangdruppel-metode van Stanley & Linskens (1974) is maandeliks op die gebergde stuifmeel uitgevoer. Die kiemingsmediums het bestaan uit 5%; 10% of 15% sukrose, elk met 0,005% boorsuur opgelos in gedistilleerde water. Stuifmeelkorrels is vir 48 uur in die kiemingsmediums by 28° C geïnkubeer. Ontkiemde en nie-ontkiemde stuifmeelkorrels van agt mikroskoopgesigsvelde (twee hangdruppels per spesie, per toetsessie, dit wil sê twee mikroskoopplaatjies), van die projeksieligmikroskoop is vir die berging van stuifmeel by 5° C en 25° C, getel. Elke mikroskoopgesigsveld is as 'n herhaling beskou, aangesien daar telkens nie minder as 30 ontkiemde en nie-ontkiemde stuifmeelkorrels getel is nie. By -196° C en vriesdroging is vier keer honderd stuifmeelkorrels getel van vier hangdruppels, dit wil sê van vier mikroskoopplaatjies. Elke mikroskoopplaatjie is hier as 'n herhaling beskou. Stuifmeel is as gekiem beskou, indien die stuifmeelbuis se lengte twee keer die deursnee van die stuifmeelkorrel bereik het. Die aantal gekiemde stuifmeelkorrels is as persentasie van die totale aantal getelde stuifmeelkorrels per veld uitgedruk. Die resultate is statisties soos in Hoofstuk 3 uiteengesit, verwerk.

RESULTATE EN BESPREKING

1) 5° C (Heersende RH)

Die resultate word in Figuur 4.1 a tot e aangetoon. Tabel 4.3 verskaf die persentasie sukrose, gemiddelde kiemingspersentasie, standaardafwyking en die minimum en maksimum persentasie kieming tydens die aanvang van die eksperiment. Bylaag 4.1 gee 'n samevatting van die aantal waarnemings, die persentasie kieming (gemiddeld), standaardafwyking (std.afw.), minimum en maksimum persentasie kieming vir elke soort kiemingsmedium en vir elke maand waarin die stuifmeel *in vitro* gekiem is. In al die figure is statistiese gegewens aangebring deur hoofletters A, B en D wat betekenisvolle verskille tussen aanvangspersentasiekieming en persentasie kieming van die opeenvolgende maande aandui. Kleinletters (a, b en d) toon nie-betekenisvolle verskille tussen aanvangspersentasiekieming en die persentasie kieming van die opeenvolgende maande.

Een van die eerste probleme wat die data getoon het, is dat die manlike keëls van die verskillende spesies nie op dieselfde tyd stuifmeel stort nie. Stuifmeel van beide *E.ferox* (1986) en *E. caffer* is in Februarie 1986 versamel, terwyl stuifmeel van *E. lehmannii* eers in April 1986 versamel is. Hierdie twee maande verskil in aanvangstydperk bemoeilik sodoende die statistiese verwerking.

Die feit dat stuifmeel van *E. eugene-maraisii* en *E. ferox* vir herhalingdoeleindes in 1987 versamel is en dat dié kiemingstoetse tot Oktober 1987 verloop en nie eindig in September nie, bemoeilik die saak nog verder.

Tydens die aanvang van die eksperiment het die persentasie kieming vir *E. ferox* (1986) en

E. ferox (1987) aansienlik verskil by al drie verskillende kiemingsmediums (Tabel 4.3). Uit hierdie tabel is dit duidelik dat die 10% sukrose-oplossing die beste stuifmeelkiemingspersentasie by *E. ferox* (1986, 1987) en *E. lehmannii* tydens die aanvang van die eksperiment gehad het. Die beste sukrose-oplossing by *E. caffer*-stuifmeel was 15% en by *E. eugene-maraisii*-stuifmeel was dit 5% sukrose. Reeds aan die begin van die eksperiment is dit duidelik dat verskillende sukrosekonsentrasies vir die kieming van die verskillende spesies se stuifmeel noodsaaklik is. Bylaag 4.1 toon al die kiemingspersentasies van elke spesie by die drie kiemingsmediums van die daarop volgende maande aan.

Wanneer die kiemingspersentasies van *E. ferox*-stuifmeel (1986) (Figuur 4.1 a) en *E. ferox*-stuifmeel (1987) (Figuur 4.1 b) vir die maande Maart, April en Mei vergelyk word, is daar vir die jare 1986 en 1987 'n ooreenkoms in die styging van die persentasie kieming. Hierdie stygende tendens word herhaal in 1987. Indien die stuifmeelkieming van *E. ferox* (1987) en *E. eugene-maraisii* (stuifmeel versamel in dieselfde jaar, naamlik 1987) vergelyk word, is dit duidelik dat dieselfde opwaartse patroon vir die maande Februarie, Maart, April en Mei en dan weer vir die maande Julie, Augustus en September geld. 'n Afwaartse patroon vir die maande Mei, Junie en Julie kan waargeneem word (Figuur 4.1.b en Figuur 4.1 e).

Wat die verskillende sukrosekonsentrasies betref, is dit duidelik uit al die figure (Figuur 4.1 a tot 4.1 e) en Bylaag 4.1, dat die maandelikse inherente behoeftes van die stuifmeel verskil. Die persentasie kieming van *E. caffer*-stuifmeel (Figuur 4.1 c) in die jaar 1986 toon 'n styging in persentasie kieming in die maande April en Julie by 5% en 10% sukrose. Vyftien persent sukrose toon 'n styging in persentasie kieming in April en Augustus. Vir die jaar 1987 is daar by 5% en 10% sukrose 'n styging in kiemingspersentasie in April en

Augustus maar vir 15% sukrose is die styging in Mei en Augustus. Die styging in kiemingspersentasie by *E. eugene-maraisii*-stuifmeel is in April-Mei en weer in September by al drie die kiemingsmediums verkry (Figuur 4.1 e).

Tabel 4.3 Die invloed van sukrose-konsentrasies op die kiemingspersentasie van verskillende *Encephalartos*-stuifmeel tydens die aanvang van die eksperiment.

Spesie	% Sukrose	Gemiddelde aanvangs- kieming %	Std.Afw.	Minimum- Maksimum %
<i>E. caffer</i>	5	26,855	20,378	7,44-53,97
	10	27,286	11,133	14,12-46,25
	15	37,339	4,683	31,52-44,44
<i>E. ferox (1986)</i>	5	37,596	2,569	33,33-41,66
	10	57,186	5,513	52,00-66,66
	15	35,093	6,186	29,41-45,16
<i>E. ferox (1987)</i>	5	3,610	1,618	1,33-5,06
	10	10,467	7,433	3,85-17,86
	15	3,462	1,133	2,00-4,00
<i>E. lehmannii</i>	5	25,428	6,259	15,00-35,71
	10	40,141	8,370	22,22-50,00
	15	17,110	3,592	12,67-23,77
<i>E. eugene-maraisii</i>	5	37,835	4,920	31,34-42,42
	10	33,597	3,044	31,48-38,10
	15	21,135	3,950	15,79-24,24

Betekenisvolle verskille ($P < 0,001$) tussen die aanvangs- en elke maand se kieming kan ook 'n duidelike aanduiding gee van 'n moontlike patroon in die kiemingsgedrag van die verskillende stuifmeel.

Verdere statistiese verwerkings toon ten opsigte van die data dat daar hoogs betekenisvolle verskille ($P < 0,001$) bestaan tussen die sukrosekonsentrasies en die manier waarop die stuifmeel geberg word. Daar is ook betekenisvolle verskille (interaksie) tussen spesies en die maande waarin die stuifmeel geberg is (Tabel 4.4). Hierdie tabel toon ook aan dat die P-waarde van verskillende kombinasies faktore kleiner is as 0,001, wat hoogs betekenisvolle verskille aantoon.

Tabel 4.4 Variansie-analise van getransformeerde waardes van die persentasie kieming van vier *Encephalartos*-spesies se stuifmeel by 5° C en heersende RH (HH). 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.

Spesie (Sp)	Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F wh (P)	ss %
1986 <i>E. caffer</i>	% sukrose (Su)	2	6,115	3,057	91,65	< 0,001	<5
	Maand(Su. HH)	42	94,889	2,259	67,73	< 0,001	±85
	Residu	315	10,508	0,033			
	Totaal	359	111,511				

Tabel 4.4 Vervolg

Spesie (Sp)	Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	Wh>F (P)	ss %
<i>E. ferox</i>	% Sukrose (Su)	2	1,804	0,902	50,99	< 0,001	<5
	Maand(Su. HH)	42	76,435	1,820	102,87	< 0,001	±91
	Residu	315	5,573	0,018			
	Totaal	359	83,812				
<i>E. lehmannii</i>	% Sukrose	2	4,859	2,429	181,02	< 0,001	±10
	Maand(Su. HH)	36	42,437	1,179	87,84	< 0,001	±80
	Residu	273	3,664	0,013			
	Totaal	311	50,960				
1987							
<i>E. eugene-maraisii</i> en <i>E. ferox</i>	Spesie (Sp)	1	2,257	2,257	467,10	< 0,001	<5
	% Sukrose (Su)	2	5,032	2,257	467,10	< 0,001	±10
	Sp.Su	2	0,468	0,234	48,44	< 0,001	<5
	Maand(Sp. Su)	48	44,724	0,932	192,84	< 0,001	±80
	Residu	162	0,783	0,005			
	Totaal	215	53,264				

Kiemingspersentasies is telkens vergelyk. Die ss% kan egter 'n meer sinvolle verklaring gee aan al die F-waarskynlikheid waardes (P) wat kleiner is as 0,001. Ss % is die persentasie variasie verklaar deur elke effek relatief tot die totale variasie. Ss% kleiner as 5% is onbelangrik en kan blote toeval wees.

Uit Tabel 4.4 is dit duidelik dat by 5° C en heersende humiditeit en die ouderdom (tydperk van berging) die bepalende faktor is by die kieming van die stuifmeel van al vier spesies. Sodra sukrosepersentasie saam met die spesies in ag geneem word as 'n bron van variasie is die ss% kleiner as 5% en is die variasie weglaatbaar.

Die stygende en dalende persentasie kieming tydens sekere maande dui daarop dat daar 'n tipe ritme voorkom wat homself herhaal. Shukla & Shukla (1983) beskryf 'n dagritme by *Abelmoschus esculentus* en beweer dat so 'n endogene ritme van kardinale belang is by hierdie groentegewas tydens bevrugting, vrugset en produsering van die groente. 'n Vier en twintig uur endogene ritme is ook beskryf by *Avena* koleoptiele (Ball & Dyke 1954). Die styging in kiemingspersentasie van die stuifmeel in sekere maande stem ooreen met die ontvanklikheid vir bestuiwing van vroulike keëls van dieselfde spesie. Hierdie styging in kiemingspersentasie van stuifmeel en die ontvanklikheid vir bestuiwing word by *Pappea capensis* beskryf (Fivaz & Robbertse 1993).

Encephalartos-stuifmeel se kiemingspersentasies toon dat stuifmeel wat by 5° C geberg is, nog na twee jaar genoegsame kieming toon om wel bevrugting te kan bewerkstellig. Osborne *et al.* (1991, 1992) het gevind dat by temperature van 0° C en 4°C, stuifmeel van *Encephalartos* spp. 'n gemiddelde kiemingspersentasie van 50% het na 'n jaar. Stuifmeel wat in sekere jare, soos byvoorbeeld die stuifmeel van *E. ferox* wat in 1987 versamel is.

toon lae kiemingspersentasies van die versameldatum af en is moontlik toe te skryf aan eksterne faktore (temperatuur en humiditeit) en inherente faktore van die stuifmeel self.

Samevattend

Encephalartos-stuifmeel kan dus in geslote houers by 5° C (yskas) geberg word. Kwekers en broodboomliëfhebbers kan dus self die stuifmeel berg en wanneer hulle dit vir handbestuiwing benodig, is dit makliker bekombaar.

2) 25° C (Heersende RH)

E. caffer- en *E. ferox*-stuifmeel is oor 'n tydperk van 10 maande geberg vanaf Februarie 1986 tot en met November 1986 terwyl stuifmeel van *E. lehmannii* vanaf April tot November, oor 'n tydperk van agt maande (April en November ingesluit), geberg is. Die aanvangspersentasie vir *in vitro* kieming word onderskeidelik vir die 5%, 10% en 15% sukrose konsentrasies in Tabel 4.3 weergegee. Dienooreenkomstige data vir die ander bergingsmaande (in oop en geslote houers) word in Bylaag 4.2 gegee.

Stuifmeel geberg in oop houers

Encephalartos stuifmeel wat in oop houers geberg is, het kiemkragtigheid baie gou verloor soos blyk uit Fig 4.2 a-c. Die kiemingsmedium wat gebruik word om die kiemkragtigheid te toets speel wel 'n geringe rol soos blyk uit die statisties verwerkte data (Tabel 4.5). So het byvoorbeeld *E. ferox* en *E. caffer*-stuifmeel wat in 15% sukrosemedium getoets is, reeds na April en Mei nie meer gekiem nie, terwyl dit in die geval van *E. lehmannii* tot in Augustus nog kiemkragtigheid kon toon (Fig. 4.2 c). Die 5 % sukrosemedium het 'n beter aanduiding van die kiemkragtigheid by al drie spesies getoon. Veral in die geval van *E. caffer* was daar in die 5% sukrose 'n opflukking in die kieming (Fig. 4.2 b). 'n Interessante verskynsel was

die styging in kieming van *E. caffer*-stuifmeel gedurende Maart wat deur al drie die kiemingsmediums aangedui is en nog 'n verdere styging in April is deur die 5% sukrose medium aangedui.

Stuifmeel van *E. ferox* se kieming het vir die kiemingsmedium wat 10% sukrose bevat eers vinnig afgeneem, daarna 'n styging in die persentasie kieming getoon in Mei en daarna het die persentasie kieming afgeneem totdat geen kieming verkry is in Augustus. Die 5% sukrose kiemingsmedium het 'n styging in Julie en weer in September gehad (Fig. 4.2 a).

E. caffer-stuifmeel toon 'n styging in kiemingspersentasie in Maart in al die sukrose-konsentrasies wat as kiemingsmediums gebruik is (Figuur 4.2 b). Die 5% sukrose-kiemingsmedium toon 'n verdere styging in kiemingspersentasie vir April en weer 'n styging in September waarna daar geen kieming in Oktober is nie. Die 10% sukrosekonsentrasie toon 'n stelselmatige afname in kiemingspersentasie tot en met Oktober waar geen kieming meer verkry is nie. Die 15% sukrose kiemingsmedium het alreeds geen kieming in Mei getoon (Figuur 4.2 b).

E. lehmannii-stuifmeel toon vir 5% kiemingsmedium, 'n styging in kiemingspersentasie in Mei en Julie, aan. Die 15% sukrosekiemingsmedium toon slegs 'n styging in kiemingspersentasie in Augustus aan. Tien persent sukrosekiemingsmedium toon 'n stelselmatige afname in persentasie kieming. Geen styging in persentasie kieming word hier waargeneem nie (Figuur 4.2 c).

Stuifmeel geberg in digsluitende houers

Encephalartos-stuifmeel wat in digsluitende houers geberg is, toon 'n stelselmatige afname

in kiemingspersentasie (Figuur 4.2 d-f). *E. ferox*-stuifmeel toon 'n geringe styging in kiemingspersentasie tydens Mei tot Julie in die 5% kiemingsmedium (Figuur 4.2 d). Vanaf September is by *E. ferox*-stuifmeel geen verdere kieming in die drie verskillende kiemingsmediums verkry nie. Die kiemingspersentasie van dieselfde stuifmeel in 10% kiemingsmedium toon 'n afname van die begin van die eksperiment (Februarie) tot en met Junie waar geen kiemingspersentasie is nie. Daarteenoor toon die kiemingspersentasie van dié stuifmeel gekiem in 'n 5% sukrosemedium, 'n afname tot en met April en dan 'n styging in persentasie kieming tot en met Junie. Geen kiemingspersentasie word in die 5% sukrose kiemingsmedium teen Oktober gekry nie.

Stuifmeel van *E. caffer* toon 'n verhoging in persentasie kieming tydens die maand Maart vir al drie sukrosekonsentrasies van die kiemingsmediums. Slegs die 10% sukrose kiemingsmedium het 'n styging in persentasie kieming in Mei getoon. Reeds in Mei-maand het die 5% en die 15% sukrose kiemingsmediums geen kieming binne twee maande getoon (Figuur 4.2 e).

Figuur 4.2 f toon die kiemingspersentasies van *E. lehmannii*-stuifmeel. Die 10% en 15% sukrose kiemingsmedium toon 'n styging in persentasie kieming in Augustus. Vyf persent sukrosekiemingsmedium het 'n stelselmatige afname in kiemingspersentasie vanaf April tot Oktober gehad. Geen kiemingspersentasie is in September in die 10% en 15% sukrose kiemingsmediums verkry nie en vanaf Oktober het die 5% sukrose kiemingsmedium ook geen kieming getoon.

Tabel 4.5 'n Variansie-analise van getransformeerde waardes van die persentasie kieming van drie *Encephalartos*-spesies se stuifmeel by 25° C en heersende relatiewe humiditeit. 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.

Spesie (Sp)	Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F wh (P)	ss %
<i>E. caffer</i>	% sukrose (Su)	2	3,057	1,529	103,46	< 0,001	<5
	toestand van houer (oop of digsluitend) (Houer)	2	30,249	15,130	1024,00	< 0,001	±15
	Su.Houer	4	13,140	3,285	222,23	< 0,001	±7
	Maand(Su. Houer)	48	146,208	3,046	206,16	< 0,001	±70
	Residu	423	6,250	0,015			
	Totaal	479	202,259				
	<i>E. ferox</i>	% Sukrose (Su)	2	3,608	1,804	322,78	< 0,001
toestand van houer (oop of digsluitend) (Houer)		2	57,103	28,552	5109,10	< 0,001	±50
Su.Houer		4	3,800	0,950	170,01	< 0,001	<5

Tabel 4.5 Vervolg

Spesie	Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F-wh (P)	ss %
<i>E. lehmannii</i>	Maand(Su. Houer)	48	41,620	0,867	155,16	< 0,001	±40
	Residu	423	2,364	0,006			
	Totaal	479	109,579				
	% Sukrose (Su)	2	3,016	1,508	271,35	< 0,001	<5
	toestand van houer (oop of digsluitend) (Houer)	2	19,863	9,932	1786,81	< 0,001	±45
	Su.Houer	4	2,183	0,546	98,19	< 0,001	<5
	Maand(Su. Houer)	48	40,034	1,112	200,08	<0,001	±60
	Residu	339	1,884	0,006			
	Totaal	383	66,917				

Die vraag het weereens ontstaan of daar statisties betekenisvolle verskille ($P < 0,001$) tussen die kiemingspersentasie van vars stuifmeel en die stuifmeel wat sekere maande geberg is, bestaan. Statistiese verwerkings toon dat daar vir al drie spesies hoogs betekenisvolle verskille ($P < 0,001$) verkry is vir die getransformeerde persentasie kieming ($y = 2 \times \text{bgsin}((\text{sin}\% \text{kieming}/100)^2)$) ten opsigte van 'n interaksie tussen persentasie sukrose en

die toestand van die houer. Selfs interaksies tussen die toestand van die houer, persentasie sukrose en maande kombinasies is ook hoogs betekenisvol verskillend ($P < 0,001$) (Tabel 4.5). Om bloot net van die F- waarskynlikheid gebruik te maak kan 'n wanvoorstelling van die effek van variasie relatief tot die totale variasie wees. Daarom is dit meer sinvol om die $ss\%$ te gebruik wat die persentasie variasie verklaar tot die totale variasie. 'n $Ss\%$ kleiner as 5% is onbelangrik en kan toeval wees. Uit die $ss\%$ is dit duidelik dat die toestand van die houer (oop of toe) en die tydperk waarop die stuifmeel geberg is 'n groot rol in die berging van *Encephalartos*-stuifmeel speel. Die verskillende sukrose konsentrasies as toetsmedium speel egter nie so 'n groot rol nie.

Samevattend

In die geval van *E. ferox*- en *E. caffer*-stuifmeel kan die stuifmeel net vir agt maande geberg word by 25° C en heersende humiditeit voordat daar geen stuifmeelkieming is nie.

E. lehmannii-stuifmeel bly slegs vir ses maande kiemkragtig by 'n temperatuur van 25° C.

'n Temperatuur van 25° C is dus nie vir die berging van *Encephalartos*-stuifmeel vir langer periodes as agt maande geskik nie. Die duidelike afname in kiemingspersentasie van die aanvang van die eksperiment tot en met agt maande later, dui daarop dat die kwekers nie hierdie stuifmeel as lewenskragtig vir die volgende seisoen kan beskou nie en derhalwe dit nie kan gebruik vir handbestuiwing van vroulike keëls nie.

3) 5° C (Beheerde RH)

Figuur 4.3 a-j toon die kiemingspersentasies van *Encephalartos*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en by 'n beheerde RH geberg is. 'n Herhaling van die eksperiment is in 1987 gedoen met die uitsondering dat stuifmeel van *E. eugene-maraisii* gebruik is, aangesien vars

stuiwmeel van *E. lehmannii* nie in 1987 beskikbaar was nie (Figuur 4.4 a-j). Die stuiwmeel wat by 5° C en beheerde RH geberg is, se gemiddelde persentasie kieming vir elke maand word in Bylaag 4.3 weergegee.

Die kiemingspersentasies van *E. ferox*-stuiwmeel wat in 1986 versamel is, en by 20% RH geberg is toon 'n stelselmatige afname en teen September het geen stuiwmeel meer ontkiem nie. (Figuur 4.3 a). Die stuiwmeel van *E. ferox* wat by 40% en 60% RH geberg is toon kieming tot en met Mei wat 'n tydperk van slegs 3 maande verteenwoordig. Relatiewe humiditeite van 80% en hoër is nie geskik vir berging van *Encephalartos ferox*-stuiwmeel nie aangesien swamgroeï daarop plaasvind.

E. lehmannii-stuiwmeel wat by 5° C en 20% RH geberg is, kon vir 'n tydperk van 10 maande die bergingstoestand oorleef (Figuur 4.3 f) Hierdie stuiwmeel wat by 5° C en 'n RH van 80% en laer geberg is kon vir 'n tydperk van ses maande kiemkragtig bly (Figuur 4.3 g-j) waarna die kiemkragtigheid vinnig gedaal het. Stuiwmeel van *E. lehmannii* het nie swamgroeï vertoon by 'n RH van 80% nie en in 'n 10% sukrosekiemingsmedium, 'n styging in kiemingspersentasie tot 54% gehad in Oktober.

Die hoogste gemiddelde kiemingspersentasie, in 5% sukrose kiemingsmedium, was in Augustus met 42% kieming. Vyftien persent sukrosekiemingsmedium toon die hoogste gemiddelde persentasie kieming in Oktober (Bylaag 4.6). Figuur 4.3 f-j toon dat die stuiwmeel van *E. lehmannii* 'n hoër kiemingspersentasie by al die verskillende persentasies RH's in Augustus, September en Oktober het. Dit is ook opmerklik dat die verhoging in kiemingspersentasie by al drie kiemingsmediums voorkom. Om te toets of hierdie tendense

herhaal word, is vars stuifmeel geneem en dié eksperiment is in 1987 herhaal (Figuur 4.4 a-j).

Afgesien van die feit dat die aanvangspersentasie kieming van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1987 versamel is laer is as die kieming van stuifmeel versamel in 1986 is dieselfde tendense as dié van 1986 egter waargeneem (Figuur 4.4 a-e). Vanaf Mei-Junie is geen kieming verkry by die drie sukrosekiemingsmediums vir al die persentasies RH waarby stuifmeel geberg is. 'n Interessante afwyking by die stuifmeel versamel in 1987 is dat daar by die 10% en 15% sukrose kiemingsmediums vir al die RH's na die aanvangskiemingspersentasie, eers 'n styging in die kiemingspersentasie is alvorens daar 'n afname oor vier maande in die kiemingspersentasie was (Figuur 4.4 a-e). Hierdie styging in kiemingspersentasie is nie in resultate van die vorige jaar nie waargeneem nie (Figuur 4.3 a-e).

Anders as in die geval van *E. ferox*-stuifmeel kan *E. eugene-maraisii*-stuifmeel wel sonder veel verlies aan kiemkragtigheid by RH van 80% en laer en by 5° C geberg word (Figuur 4.4 f-h). Bokant 'n RH van 80% neem die kiemkrag van die stuifmeelkorrels van die begin vinnig af (Figuur 4.4 i,j). Soos in die geval by *E. ferox*-stuifmeel speel die sukrosekonsentrasie van die medium waarin die kiemkragtigheid van die stuifmeel bepaal word 'n groot rol. Anders as by *E. ferox*-stuifmeel egter, ontkiem die gebergde stuifmeel van *E. eugene-maraisii* die beste in 'n medium wat 15% sukrose en in 'n mindere mate in 'n medium met 10% sukrose (Figuur 4.4 f-h). 'n Interessante verskynsel is die toename in die persentasie gekiemde stuifmeel na berging van drie maande (Figuur 4.4 f-h) veral waar 'n medium met 15% sukrose gebruik is.

Die stuifmeel van *E. eugene-maraisii* toon 'n ander kiemingspatroon as die ander twee spesies reeds genoem (Figuur 4.4 f-j). Stuifmeel geberg by 20%, 40% en 60% RH toon goeie gemiddelde persentasies kieming (Bylaag 4.5) met 15% sukrose. Julie toon die hoogste persentasie kieming van stuifmeel wat by 20% en 40% RH geberg is (Figuur 4.4 f,g). Die stuifmeel wat by 60% RH geberg is, toon 'n styging in persentasiekieming in Mei en Julie (Figuur 4.4h). 'n Konstante relatiewe humiditeit van 80% en 90% is nie geskik vir die berging van *Encephalartos eugene-maraisii*-stuifmeel nie, aangesien daar binne drie maande in die geval van 90% RH en vyf maande in die geval van 80% RH geen kieming verkry is nie (Figuur 4.4 j & 4.4 i).

Die styging in kiemingspersentasie na berging by sekere relatiewe humiditeite toon moontlik 'n verband met die RH in natuurlike staat in 'n somerreënvalstreek. Die stuifmeel wat in verskillende persentasies sukrose gekiem is, dui daarop dat die stuifmeel se inherente behoeftes op sekere tye van die jaar verskil.

Statistiese verwerking van die persentasie kieming by elke spesie toon in Figuur 4.3 a-j en 4.4 a-j betekenisvolle verskille tussen aanvangskiemingspersentasie en die opeenvolgende maande se kiemingspersentasies aangedui deur hoofletters (A, B en D). Kleinletters (a, b en d) toon die nie-betekenisvolle verskille aan. Verskillende bron van variasies is ook vergelyk (Tabel 4.6). Uit die ss% is dit duidelik dat die spesies wel van mekaar verskil en dat die humiditeite 'n merkbare rol speel in die berging van *Encephalartos*-stuifmeel.

Tabel 4.6 Variansie-analise van getransformeerde waardes van die kiemingspersentasies van *E. ferox*-en *E. eugene-maraisii*-stuifmeel wat by 'n temperatuur van 5° C en beheerde relatiewe humiditeit (RH) geberg is. v.g.-vryheidgraad, sk-som van kwadrate, gsk-gemiddelde som van kwadrate, F-F-toets van die behandelingseffek, F wh (P)-oorkrydingswaarskynlikheid, ss%-persentasie variasie verklaar relatief tot die totale.

Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F wh (P)	ss %
Spesie (Sp)	1	94,128	94,128	14946,69	< 0,001	±20
Sukrose (Su)	2	1,954	0,977	155,17	< 0,001	<5
Sp.Su	2	1,502	0,751	119,28	< 0,001	<5
Relatiewe humiditeit (RH)	4	84,269	21,067	3345,28	< 0,001	±20
Sp.RH	4	36,800	9,200	1460,87	< 0,001	±10
Su.RH	8	5,507	0,6884	109,32	< 0,001	<5
Sp.Su.RH	8	5,974	0,747	118,57	< 0,001	<5
Maand(Sp.Su.RH)	240	164,213	0,684	108,65	<0,001	±40
Residu	810	5,101	0,006			
Totaal	1079	399,448				

Samevattend

Encephalartos-stuifmeel wat getoets is kan by toestande wat matig, is dit wil sê 'n RH van 20% tot en met 60% by 5° C, vir kort periodes (3 tot 10 maande) geberg word. 'n Vermindering in lewenskragtigheid en dus ook kiemkragtigheid by die toestande is egter aan die orde van die dag. Hierdie tendens stem baie ooreen met eksperimente wat alreeds oor die afgelope vyftig jaar op ander stuifmeel gedoen is. King beskryf die hele aangeleent=

heid dan ook reeds in 1965. Tereg skryf hy dat die spesifieke optimum kombinasie van temperatuur en humiditeit natuurlik sal verskil en varieer tussen spesies, hoe groter die verwantskap tussen die spesies is soveel te meer sal die bergingstoestande ooreenstem. Telkens wanneer die tydfaktor as bron van variasie by ander bronne van variasies gevoeg word, is die ss% hoër en dui dit aan dat die ouderdom van die stuifmeel 'n bepalende rol speel.

4) 25° C (Beheerde RH)

Die gemiddelde persentasie kieming, minimum- en maksimum persentasie kieming en standaardafwyking van drie *Encephalartos*-spp. se stuifmeel, wat onder hierdie toestande geberg is, word in Bylaag 4.4 weergegee. In die geval van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1986 versamel is toon die kiemingspersentasies 'n vinnige afname tot so 'n mate dat daar binne vier maande geen kieming in al drie kiemingsmediums meer is nie (Figuur 4.5 a-c).

'n Vergelyking van die stuifmeelkieming van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1986 en 1987 versamel is en by humiditeite van 20%, 40% en 60% geberg is, toon dat 1987 stuifmeel se kiemingspersentasie eers in April styg en daarna na nul daal (Figuur 4.6 a-c). Stuifmeel wat in 1986 versamel is, toon 'n stelselmatige daling in kiemingspersentasie alvorens dit by 20%, 40% RH in Junie en by 60% RH na Mei nie meer ontkiem nie (Figuur 4.5 a-c).

Die 80% en 90% RH toon dieselfde tendens deurdat die kiemkragtigheid binne die eerste maand of twee tot niet gaan (Figuur 4.5 d,e). Indien die kiemingspersentasies van eersgenoemde spesie se stuifmeel vergelyk word met die ander twee spesies naamlik, *E. lehmannii* (Figuur 4.5 f-h) en *E. eugene-maraisii* (Figuur 4.6 f-h), blyk dit dat *E. lehmannii*-stuifmeel 'n groter verdraagsaamheid teenoor 20% en 40% RH toon. Hierdié

stuifmeel het eers na agt maande in Oktober 1986 die nulpunt bereik. Wat die 60% RH by hierdie spesie betref, het die stuifmeel reeds in April 1986 geen kieming vertoon nie en stem dit ooreen met die ander twee spesies.

Stuifmeel van *E. eugene-maraisii* toon 'n styging in kiemingspersentasie by beide 20% en 40% RH (Figuur 4.6 f,g) in Mei. Gebergde stuifmeel van dieselfde spesie by 60% RH toon 'n stelselmatige afname in kiemingspersentasie tot en met Mei waartydens geen kieming aangetoon is nie (Figuur 4.6 h). Wat die 80% en 90% RH betref, is hierdie bergingstoestand totaal onbruikbaar by al drie *Encephalartos*-spp se stuifmeel wat ondersoek is (Figuur 4.5 e, 4.6 e, 4.5 j & 4.6 j). Swambesmetting het by hierdie RH ingetree en vir langtermyn berging is sulke toestande ongeskik. Lae kiemingspersentasies kan moontlik ook toegeskryf word aan die dissosiasie van die endoplasmiese retikulum net soos by tabakstuifmeel (Ciampolini *et al.* 1991). Verdere studie in die verband kan moontlik lig op die onderwerp gee.

Die negatiewe r-waarde wat toegeken is aan humiditeit tydens statistiese verwerkings bevestig dat die kiemingspersentasies met hoër humiditeite afneem. In teenstelling met *Encephalartos*-stuifmeel, kan Graminae-stuifmeel se lewenskragtigheid behoue bly by hoë humiditeite van 70% en hoër en gekontroleerde temperature van 25° C (King 1965).

Betekenisvolle verskille tussen die aanvangskiemingspersentasies en die ander maande waarin kieming gemonitor is, is op figuur 4.5 a-j en 4.6 a-j (met hoofletters A, B en D) aangetoon. Uit tabel 4.7 is dit duidelik dat humiditeit wel 'n rol speel as 'n bron van variasie maar ouderdom van die stuifmeel is by verre die belangrikste faktor. Die ss% van spesie, persentasie sukrose en hulle interaksies is kleiner as 5 % wat nie betekenisvol is nie en kan blote toeval wees.

Tabel 4.7 Variansie-analise van getransformeerde waardes van die kiemingspersentasies van *E. ferox*-en *E. eugene-maraisii*-stuifmeel wat by 'n temperatuur van 25° C en beheerde relatiewe humiditeit (RH) geberg is. 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.

Bron van variasie	vg	sk	gsk	F	F wh (P)	ss %
Spesie (Sp)	1	12,321	12,321	3440,74	< 0,001	±6
Sukrose (Su)	2	0,481	0,241	67,22	< 0,001	<5
Sp.Su	2	0,372	0,186	51,93	< 0,001	<5
Relatiewe humiditeit (RH)	4	17,579	4,395	1227,27	< 0,001	±10
Sp.RH	4	2,924	0,731	204,11	< 0,001	<5
Su.RH	8	0,535	0,067	18,66	< 0,001	<5
Sp.Su.RH	8	0,491	0,061	17,13	< 0,001	<5
Maand(Sp.Su.RH)	240	141,792	0,591	164,98	<0,001	±80
Residu	810	2,901	0,004			
Totaal	1079	179,395				

Samevattend

Uit hierdie studie blyk dit dat dit nie die moeite en koste werd is om *Encephalartos*-stuifmeel by kunsmatig beheerde RH te berg nie. Nogtans is die studie uitgevoer om seker te maak dat die metode nie dalk moontlikhede kon inhou nie.

5) -196° C (Vloeibare stikstof)

In hierdie ondersoek is stuifmeel van twee *Encephalartos*-spp. gebruik. Figuur 4.7 a-b toon die kiemingspersentasies verkry tydens die onderskeie maande se kiemingstoetse. Die kiemingspersentasies statisties verwerk en op die figure is die betekenisvolle verskille tussen aanvangspersentasiekieming en die opeenvolgende maande aangetoon. Bylaag 4.5 toon die gemiddelde kiemingspersentasie van elke maand asook die maksimum- en minimum persentasie kieming wat elke maand verkry is.

Van al die bergingstoestande wat ondersoek is, het berging van stuifmeel in vloeibare stikstof die beste resultate gelever (Figuur 4.7 a,b). Die kiemingsmedium met 15% sukrose het beter gevaar as media met laer suikerkonsentrasies. Dit is interessant dat die kiemingssyfers van beide *E. ferox*- en *E. eugene-maraisii*-stuifmeel laag begin het, verbeter het in April en Mei, gedaal het in Junie weer gestyg het in Julie tot September en daarna weer gedaal het in Oktober. Hierdie reëlmatige fluktuasie is moeilik om te verklaar.

'n Styging in persentasie kieming by *E. ferox*-stuifmeel wat in 1987 versamel is geskied in Mei en September (Figuur 4.7 a) wat korreleer met die styging in kiemingspersentasie van dieselfde stuifmeel wat by 5° C geberg is (Figuur 4.1 b). 'n Verskil kom egter by die maand Julie waar 'n styging in kiemingspersentasie by die -196° C gebergde stuifmeel voorkom.

E. eugene-maraisii-stuifmeel wat in vloeibare stikstof geberg is (Figuur 4.7 b), toon ook 'n ooreenkoms met die gebergde stuifmeel van dieselfde spesie by 5° C (Figuur 4.1 e), deurdat 'n styging in kiemingspersentasie vir die 5% en 15% kiemingsmedium voorkom. 'n Verskil kom ook voor in die persentasie sukrose wat as kiemingsmedium gebruik word aangesien daar vir elke maand in 'n spesifieke kiemingsmedium 'n verskil in die maksimum kiemings=

persentasie voorkom. Dit wil dus voorkom of *Encephalartos*-stuifmeel oor 'n langer tydperk kiemkragtig bly as dit by -196° C geberg word.

Aartappel-stuifmeel geberg in vloeibare stikstof toon ook geen beduidenis van 'n afname in kiemingspersentasie na nege maande nie, maar toon wel 'n afname in kiemingspersentasie waar dit oor dieselfde tydperk by 20° C geberg is (Weatherhead *et al.* 1978). *Verticordia*-stuifmeel geberg by -196° C behou ook 75%-80% kiemkragtigheid vir ses maande (Tyagi *et al.* 1992).

Samevattend

In hierdie eksperiment is die *Encephalartos*-stuifmeel slegs vir agt maande geberg en het die kiemkragtigheid behoue gebly. Verdere ondersoeke waar stuifmeel oor 'n langer tydperk as agt maande geberg word, is nodig om vas te stel hoe lank dié stuifmeel onder hierdie toestande nog kiemkragtig sal wees.

6) Vriesdroging

Stuifmeel van twee *Encephalartos*-spp. is gevriesdroog en daarna by 5° C (yskas) (Figuur 4.8 a,b) en -25° C (vrieskas) (Figuur 4.8 c,d) geberg. Bylae 4.6 en 4.7 toon die gemiddelde persentasie kieming en die maksimum- en minimum persentasie kieming van elke maand van dié *Encephalartos*-spp.

Die ontkiemingsgedrag van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en geberg is by 5° C (heersende RH) (Figuur 4.1b) stem in breë trekke ooreen met die gevriesdroogde stuifmeel wat geberg is by 5° C en -25° C (Figuur 4.8 a,b). Na agt maande se berging van laasgenoemde stuifmeel is daar nog steeds stuifmeelkorrels wat kiemkragtig was.

Uit Figuur 4.8 a-d is die volgende tendens opvallend. 'n Styging in persentasie kieming kom in April, Julie en September voor, terwyl 'n afname in persentasie kieming in Junie en September voorkom. Hierdie fluktuasies in die kiemingspersentasies van die stuifmeel kom feitlik ooreen vir al die *Encephalartos*-stuifmeel wat gevriesdroog is en by 5° C en -25° C geberg is. Stuifmeel van *E. eugene-maraisii* geberg by 5° C (heersende RH), toon 'n toename in kiemingspersentasie tydens April. Hierdie tendens kom ooreen met stuifmeel wat gevriesdroog is by dieselfde spesie (Figuur 4.1 e & 4.8 d).

Hierdie twee maniere van berging na vriesdroging, naamlik by 5° C en -25° C, toon dieselfde kiemingspatroon by beide *Encephalartos*-spesie. Dit maak dus nie 'n verskil by watter temperatuur hetsy 5° C of -25° C na vriesdroging die stuifmeel geberg is nie. Dieselfde tendens vind Layne & Hagedorn (1963) by ertjiesuifmeel wat by 8° C en -25° C geberg is na vriesdroging. Davies en Dickinson (1971) vind in hulle studies van leliestuifmeel dat vriesdroging nie alleen die deurlaatbaarheid van membrane beïnvloed nie, maar hulle vind ook dat die stuifmeel wat gevries is sonder om gedroog te word, dieselfde respirasie en deurlaatbaarheidswaardes as die kontrole toon. Daarom dat die kiemingspersentasies van stuifmeel wat gevriesdroog is, nog dieselfde vertoon as by gewoon gebergde (5° C) stuifmeel. Dit is dus die drogings- en nie die vriesingproses, wat beskadiging van (of inhibering van) die biochemiese aktiwiteit van funksionele membrane te weeg bring. Die verandering in membraanstruktuur is moontlik gekorreleer met die verlies van residuele gebinde water (Davies *et al.* 1971). Verdere studie in hierdie verband om presies te bepaal wat die optimale drogingstyd by *Encephalartos*-stuifmeel behoort te wees, kan gedoen word. Wat wel verblydend is, is die feit dat *Encephalartos*-stuifmeel wel goeie kiemingsresultate toon onder hierdie bergingsmetode.

Oor die algemeen wil dit voorkom of 10% sukrose saam met 0,005% boorsuur beter kiemingspersentasies lewer. Daar is wel sekere maande waarin 5% of 15% sukrose in die kiemingsmedium beter resultate toon. Dit kan moontlik toegeskryf word aan inherente behoeftes van die stuifmeelkorrels wat wissel van maand na maand of selfs van jaar tot jaar. Vaugton (1991) beskryf 'n soortgelyke tendens by stuifmeel van *Banksia spinulosa*.

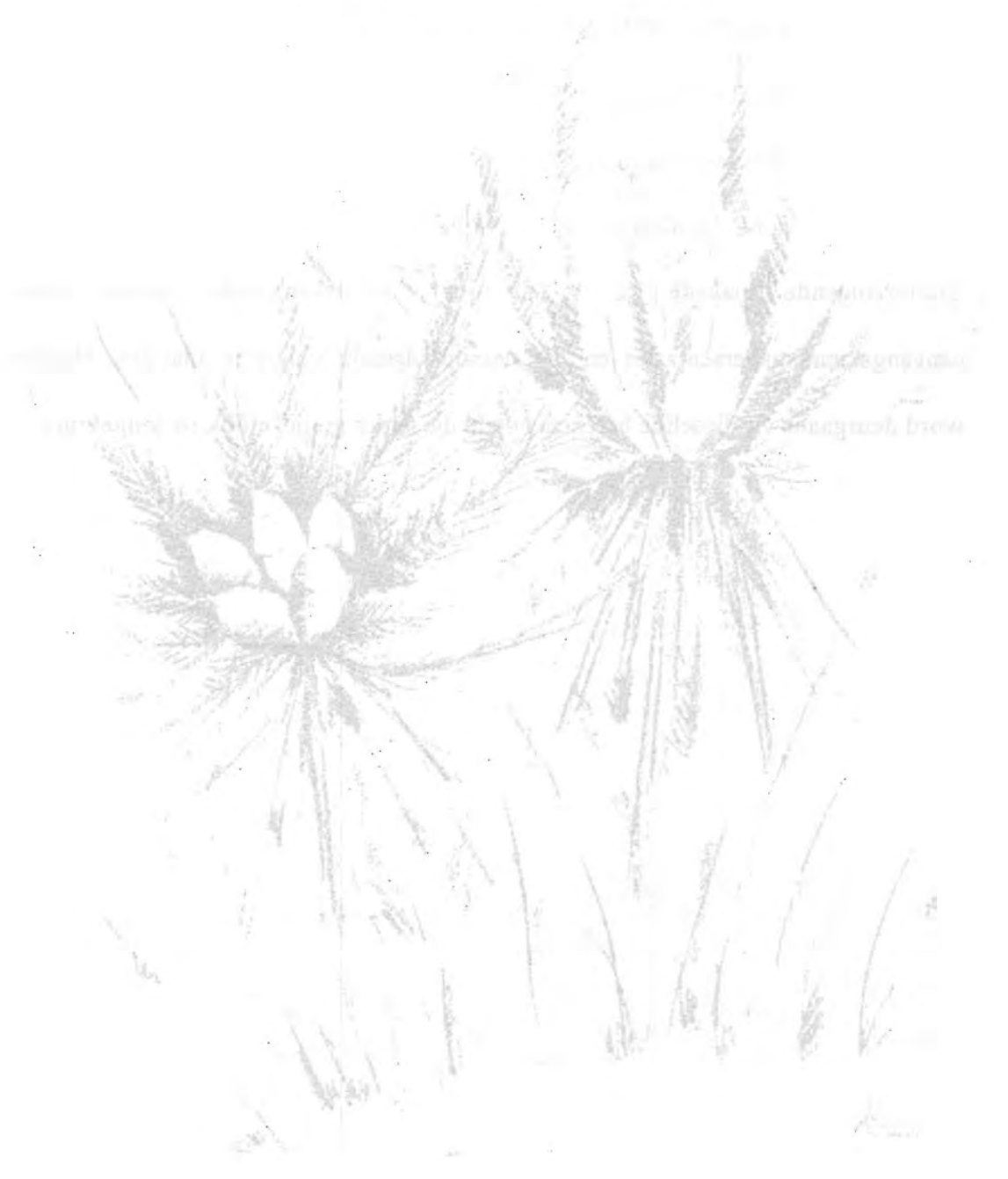
Samevatting

Encephalartos-stuifmeel toon 'n beter kiemingspersentasie tydens berging by 5° C (heersende RH) vir periodes langer as 'n jaar. Die stuifmeel wat geberg is by -196° C en die wat gevriesdroog is kan vir ten minste agt maande geberg word sonder dat die stuifmeel totale kiemkragtigheid verloor. Hierdie resultate van laasgenoemde bergingstoestande kan gebruik word as 'n gidsstudie om die eksperiment oor 'n langer tydperk te laat verloop. Sodoende kan die presiese aantal maande (dae) waaronder *Encephalartos*-stuifmeel by die toestande nog steeds kiemkragtig is, bepaal word.

Hoë relatiewe humiditeite van 80% en hoër ongeag die temperatuur, is nie geskik vir die berging van *Encephalartos*-stuifmeel nie. Berging by humiditeite van 20% tot 60% en 'n temperatuur van 5° C, het slegs vir vier maande kiemkragtige stuifmeel getoon en is dus ongeskik vir berging van stuifmeel van hierdie genus.

Wat die kiemingsmedium betref vir die toets van lewenskragtigheid na berging, word 10% sukrose saam met 0,005% boorsuur in gedistilleerde water, aanbeveel.

FIGUURBLAD

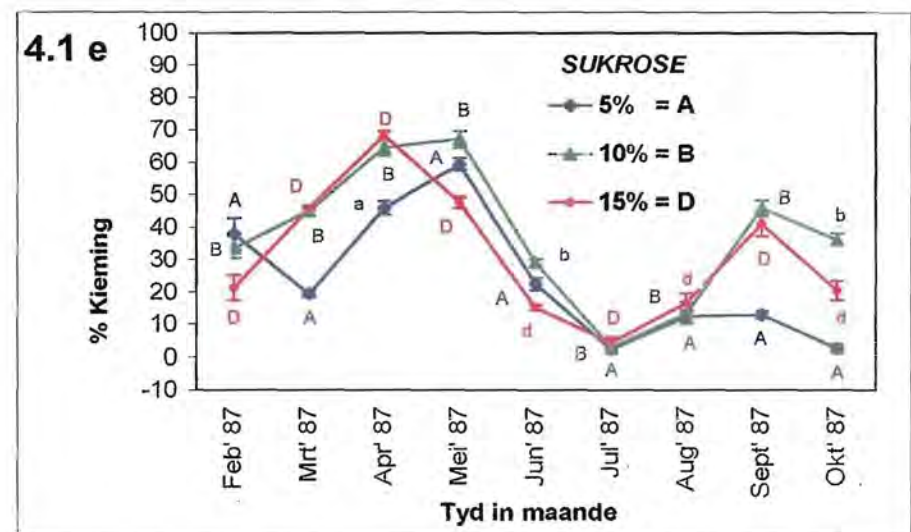
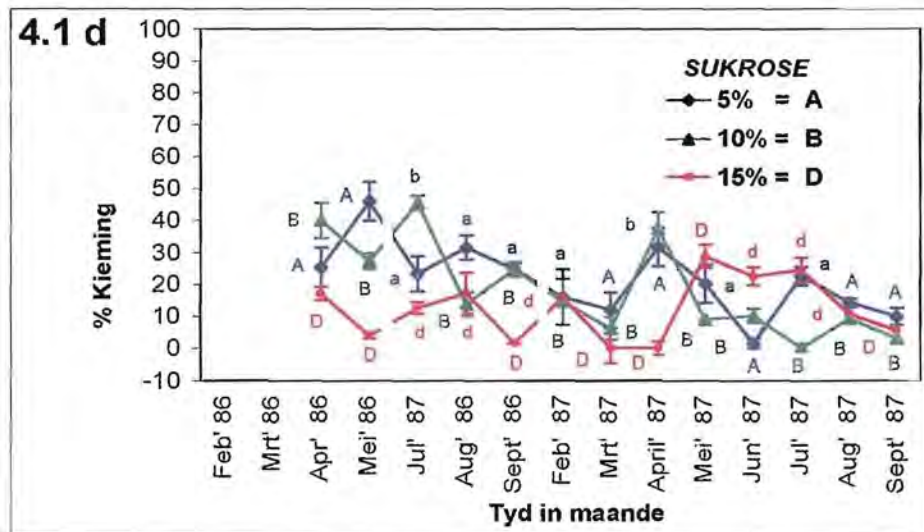
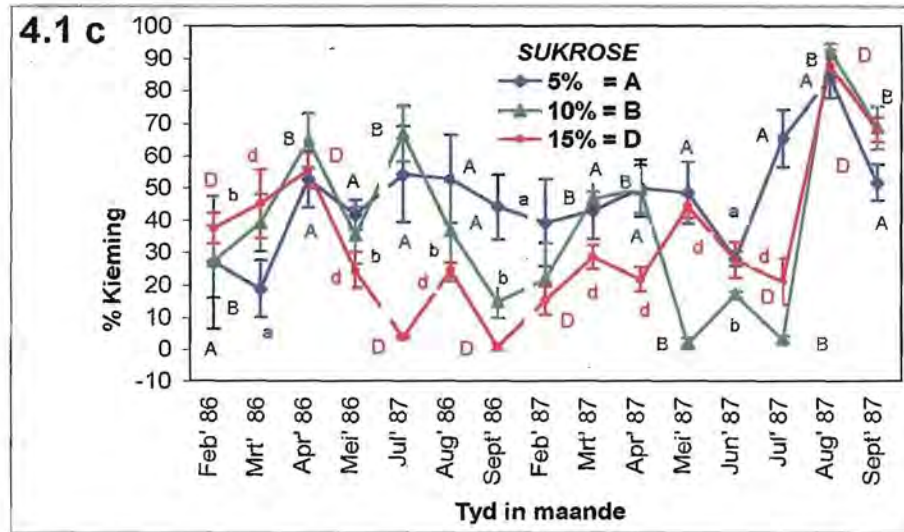


Figuur 4.1 Persentasie kieming van stuifmeel wat by 5° C en heersende RH geberg is.

a. *E. ferox*-stuifmeel versamel in 1986.

b. *E. ferox*-stuifmeel versamel in 1987.

A, B, D toon betekenisvolle verskille tussen aanvangskiemingspersentasie en daaropvolgende maande. a, b, d toon nie-betekenisvolle verskille tussen die aanvangskiemingspersentasies en die daaropvolgende volgende maande. Hierdie letters word deurgaans vir dieselfde betekenis op al die ander grafieke ook so aangebring

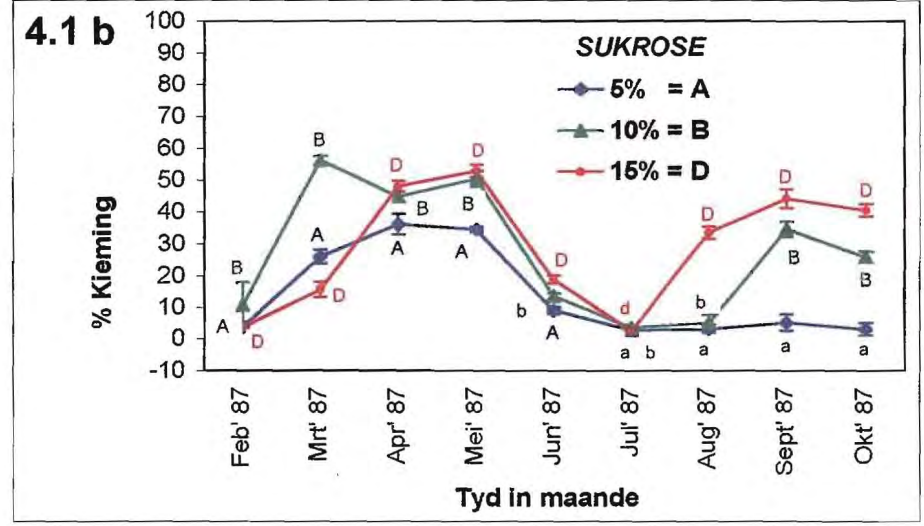
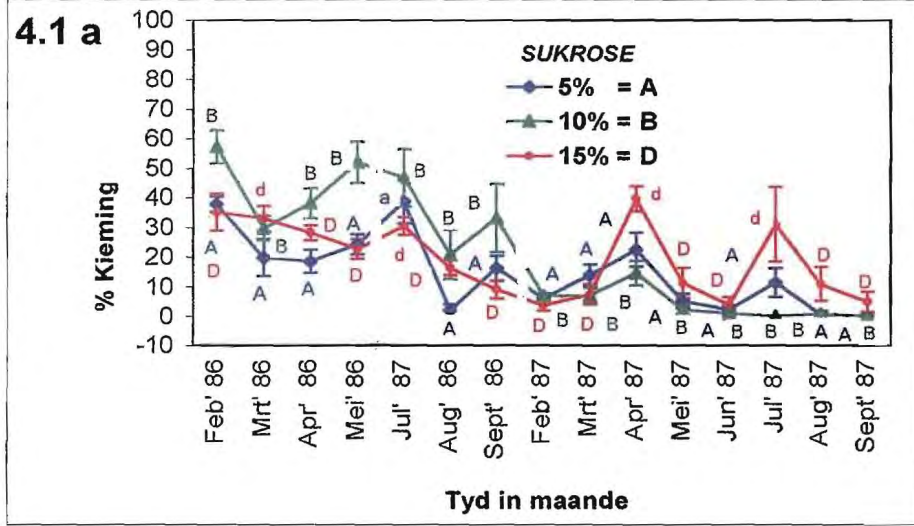


Figuur 4.1 Persentasie kieming van stuifmeel wat by 5° C en heersende RH geberg is.

c: *E. caffer*-stuifmeel versamel in 1986.

d: *E. lehmannii*-stuifmeel versamel in 1986.

e: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel versamel in 1987.

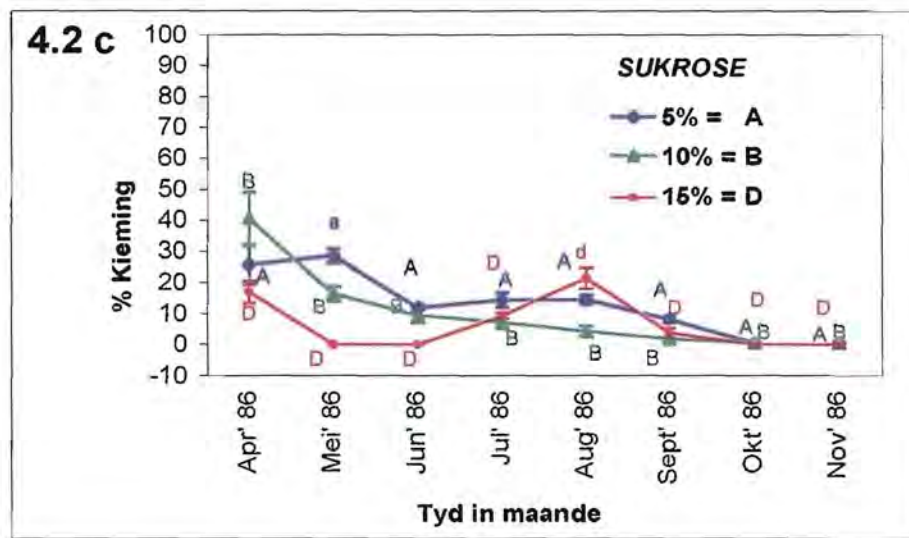
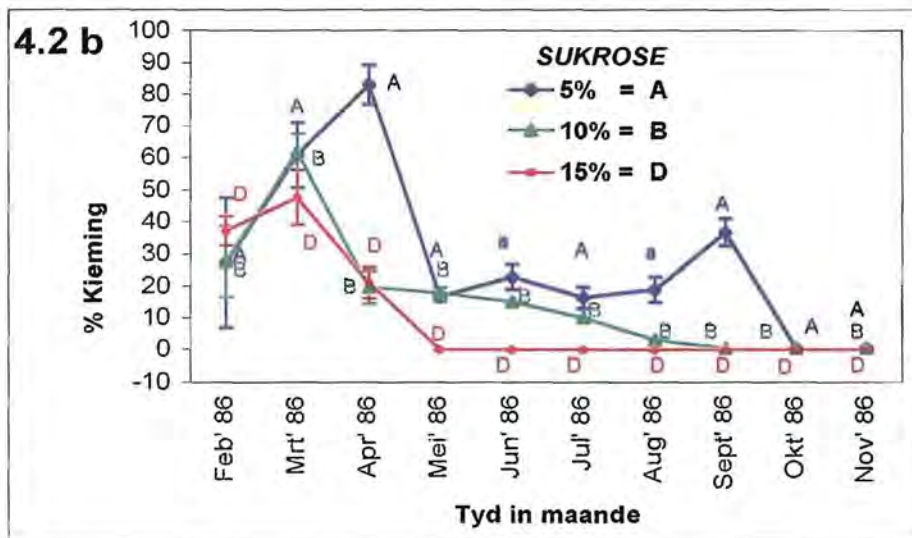
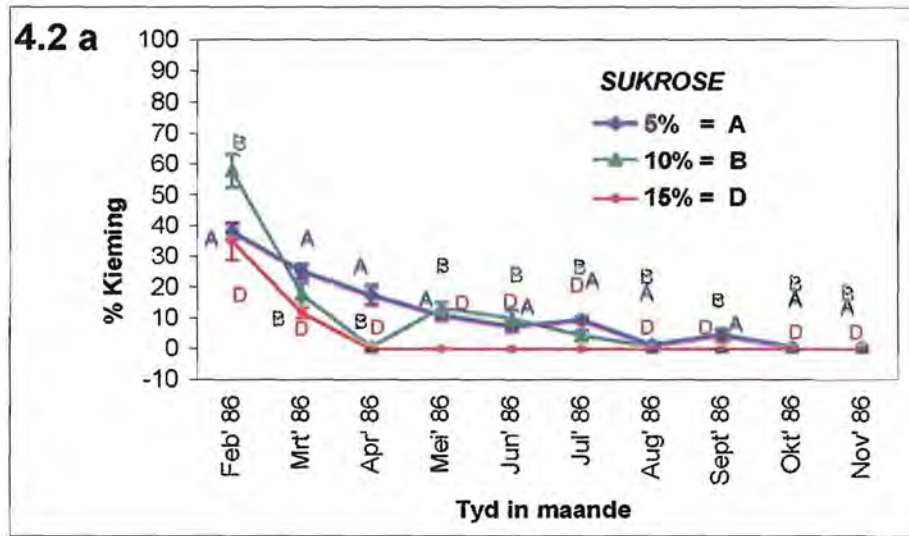


Figuur 4.2 Persentasie kieming van stuifmeel wat vanaf Februarie tot November by 25° C in 'n oop houer geberg is.

a: *E. ferox*-stuifmeel

b: *E. caffer*-stuifmeel

c: *E. lehmannii*-stuifmeel

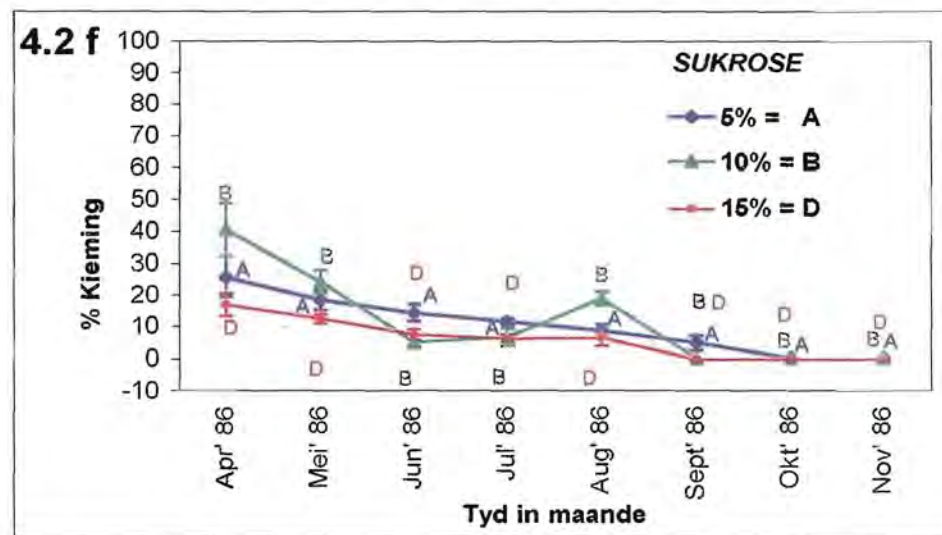
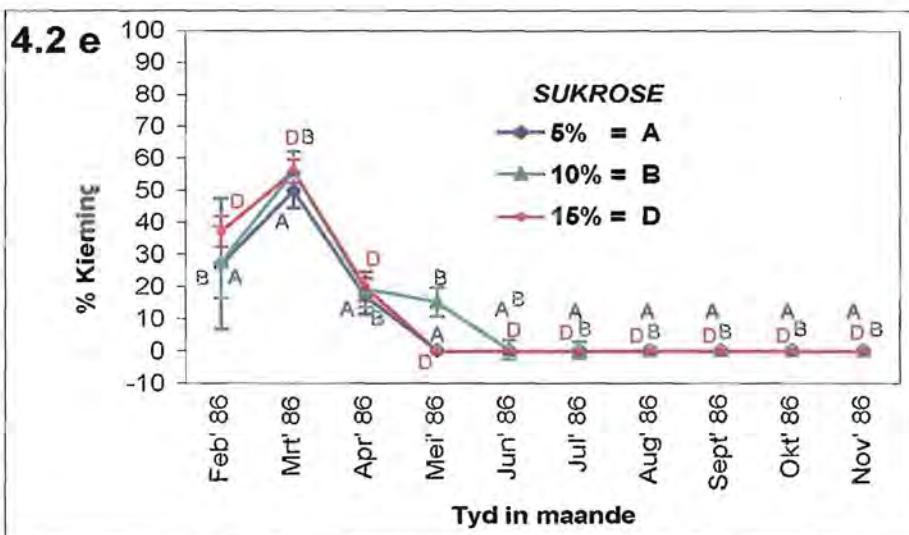
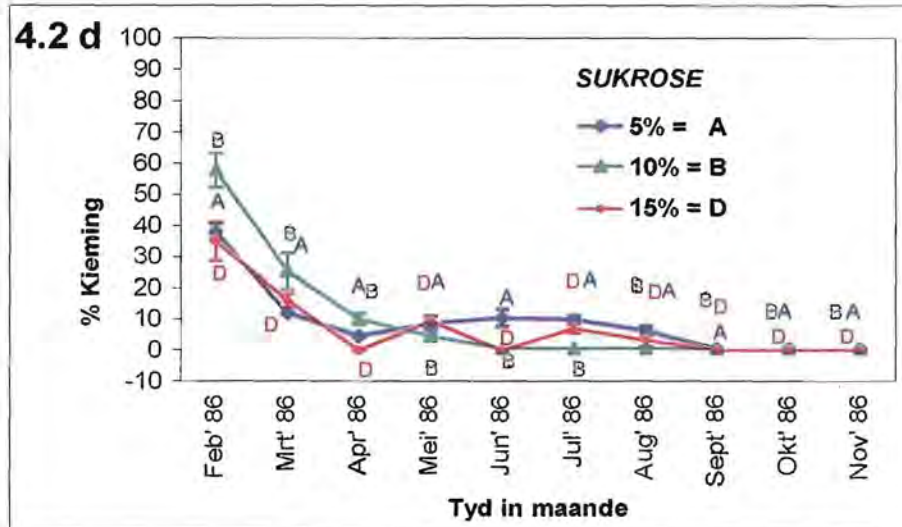


Figuur 4.2 Persentasie kieming van stuifmeel wat vanaf Februarie tot November by 25° C in geslote houers geberg is.

d: *E. ferox*-stuifmeel

e: *E. caffer*-stuifmeel

f: *E. lehmannii*-stuifmeel



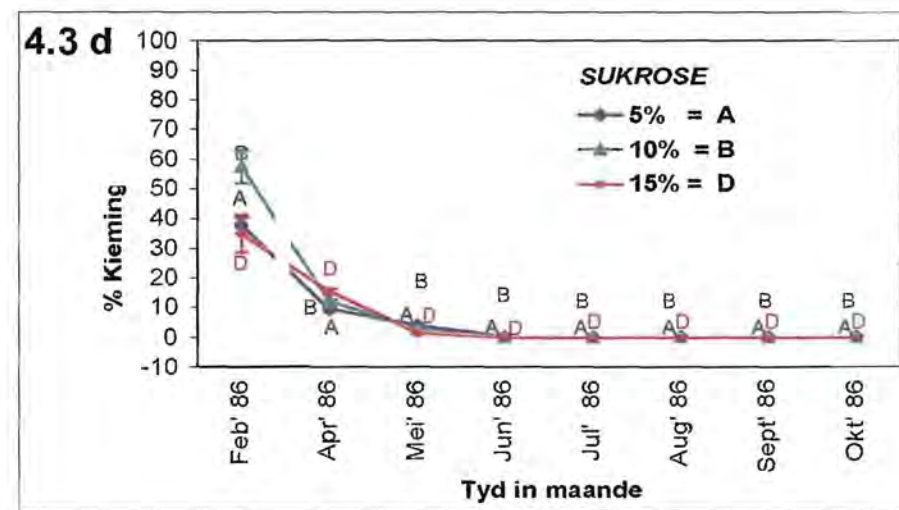
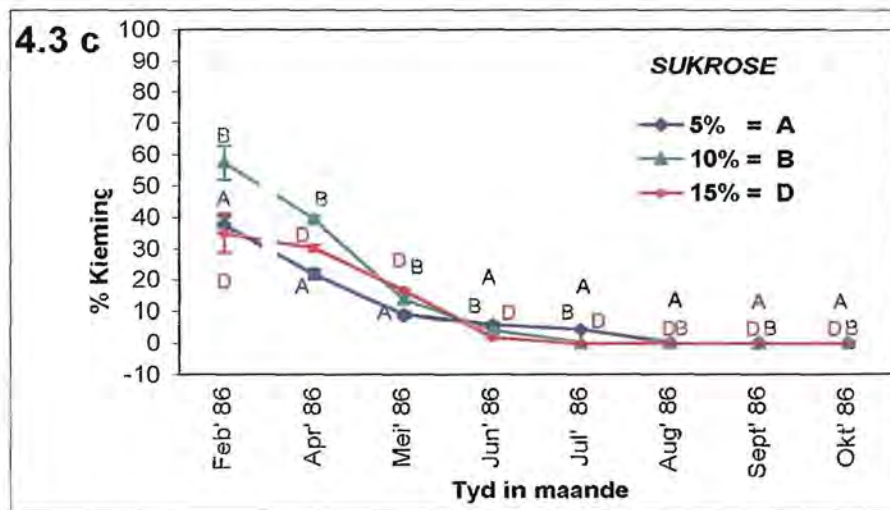
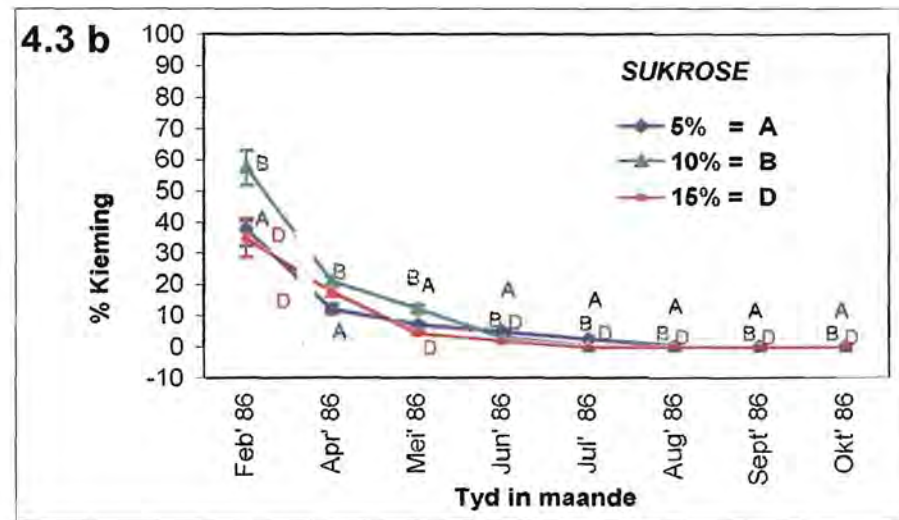
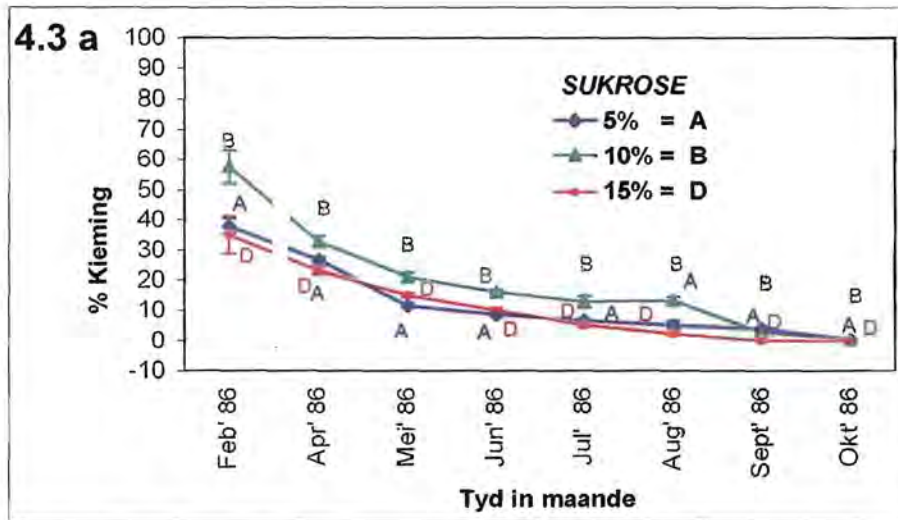
Figuur 4.3 Persentasie kieming van *Encephalartos ferox*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en by 5° en beheerde RH geberg is.

a: 20% humiditeit

b: 40% humiditeit

c: 60% humiditeit

d: 80% humiditeit



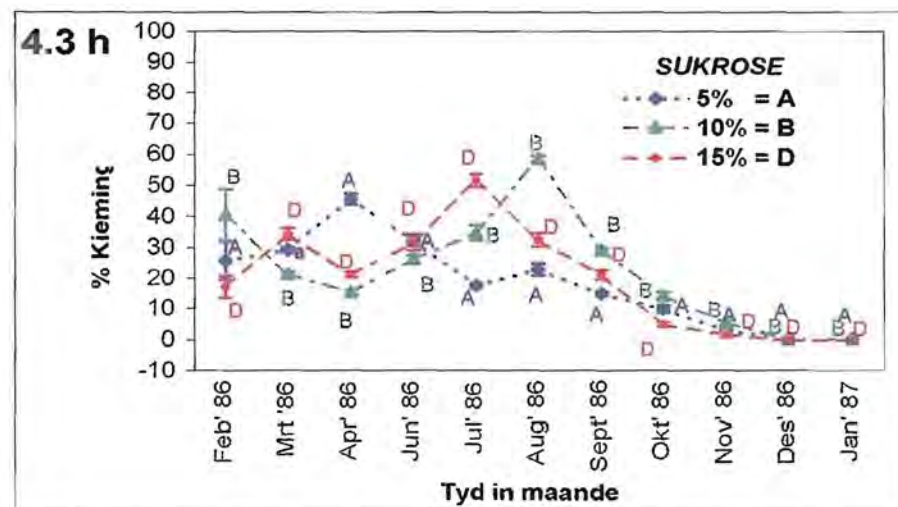
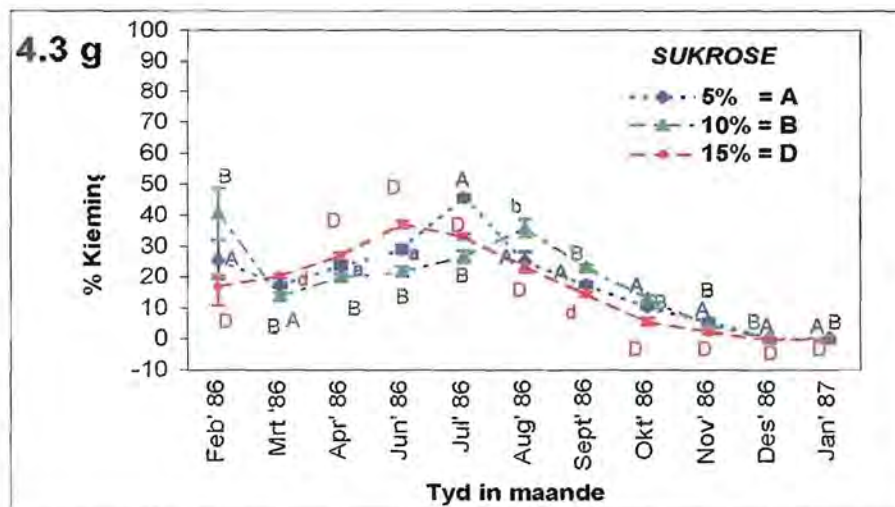
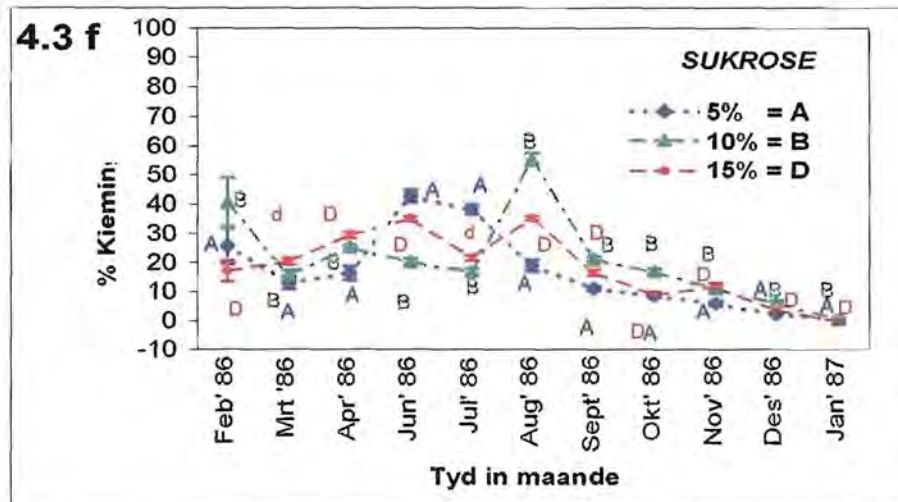
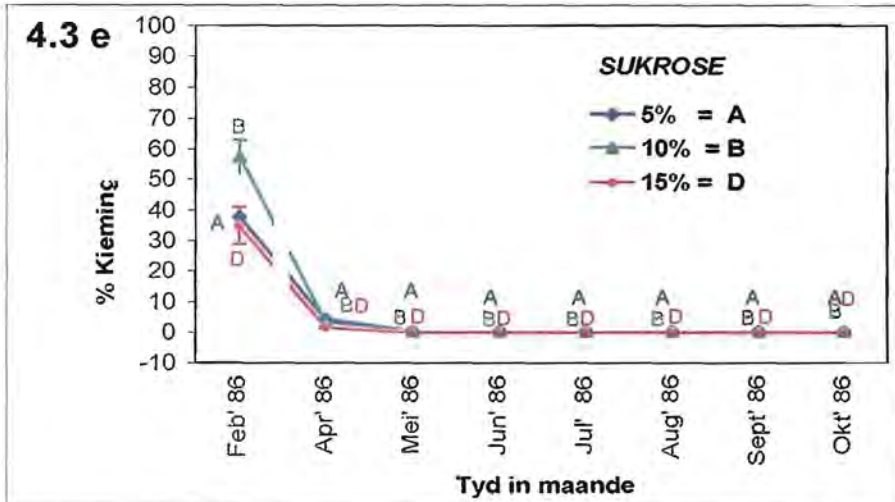
Figuur 4.3 Persentasie kieming van *Encephalartos*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en wat by 5° C en beheerde RH geberg is.

e: *E. ferox*-stuifmeel by 90% RH

f: *E. lehmannii*-stuifmeel by 20% RH

g: *E. lehmannii*-stuifmeel by 40% RH

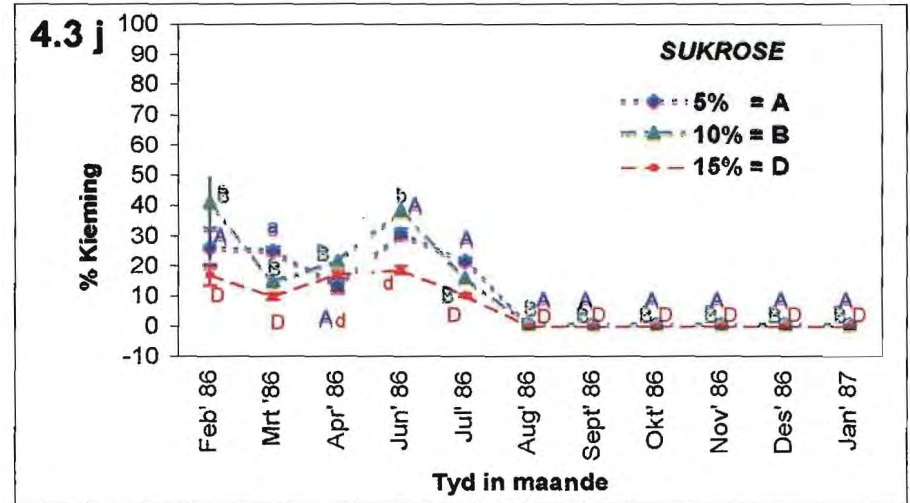
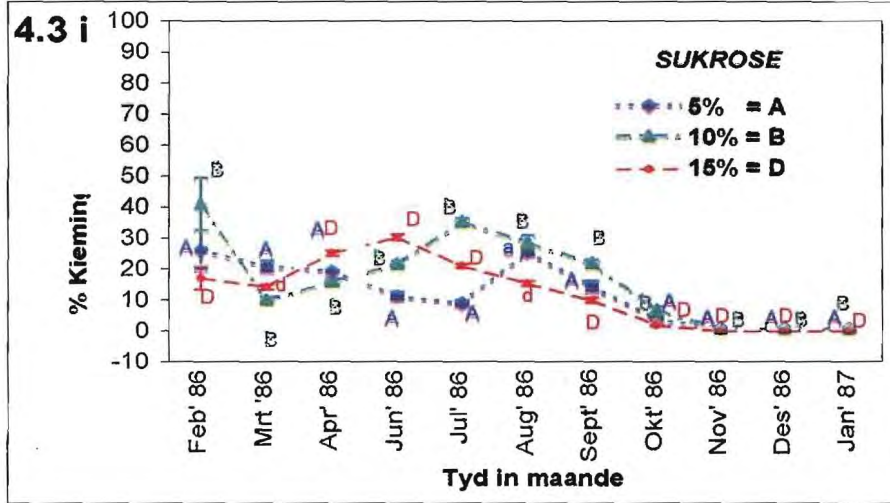
h: *E. lehmannii*-stuifmeel by 60% RH



Figuur 4.3 Persentasie kieming van *E. lehmannii*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en by 5° C en beheerde RH geberg is.

i: 80% RH

j: 90% RH



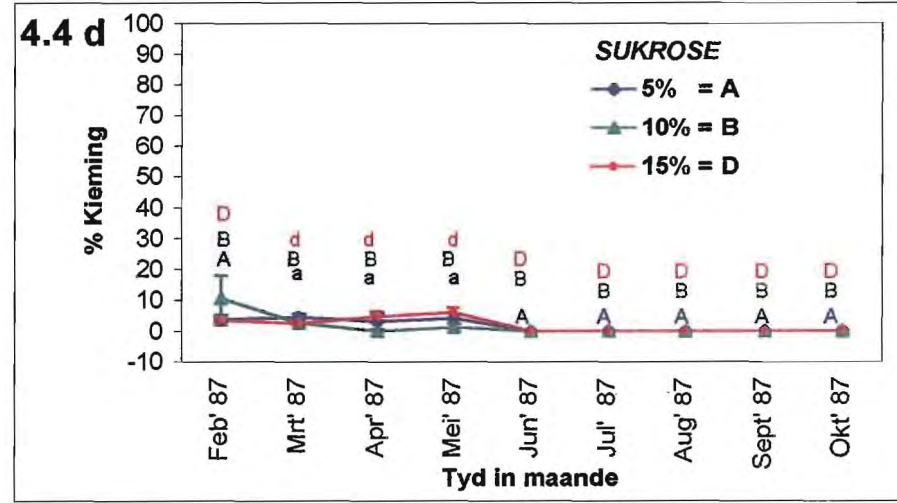
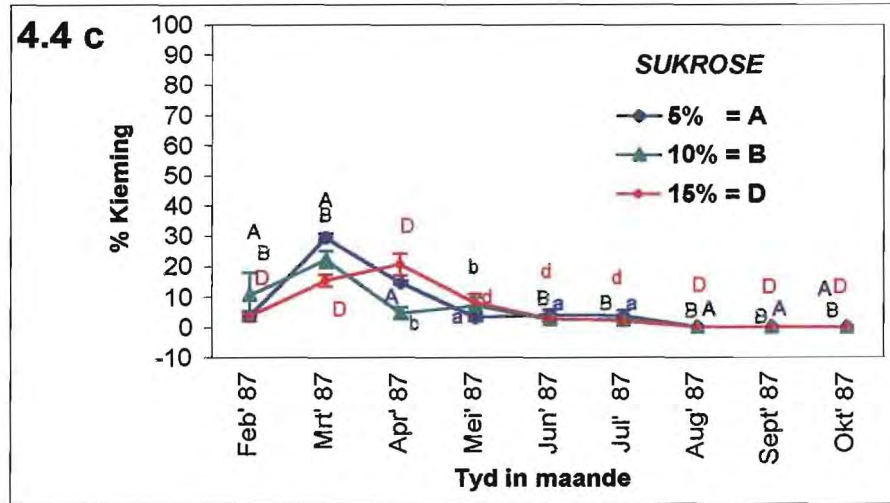
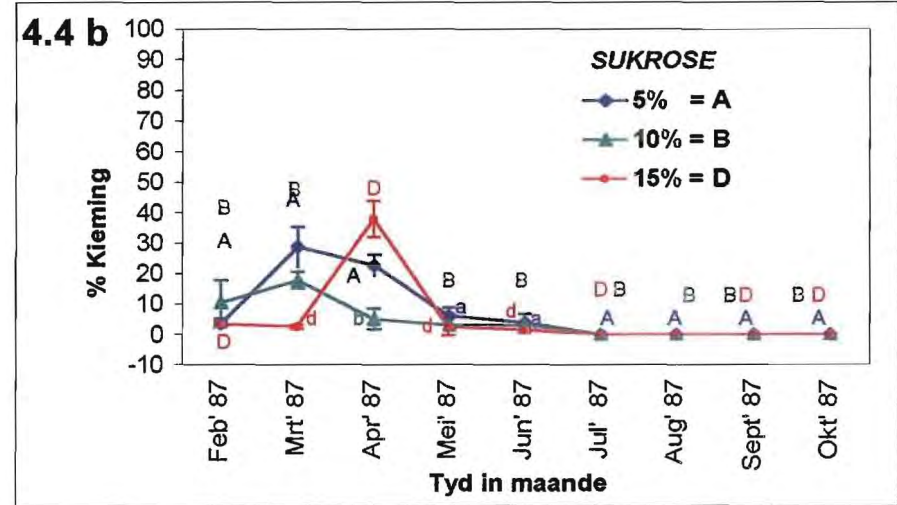
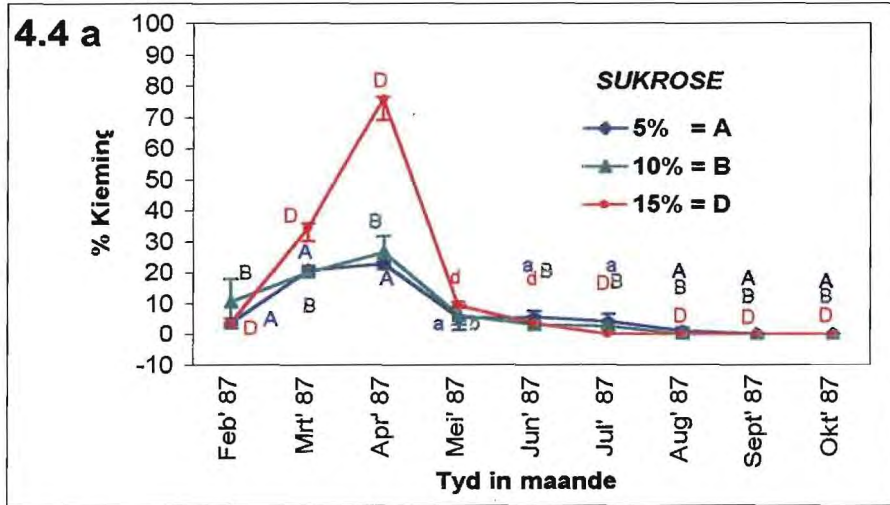
Figuur 4.4 Persentasie kieming van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en by 5° C en beheerde RH geberg is.

a: 20% RH

b: 40% RH

c: 60% RH

d: 80% RH



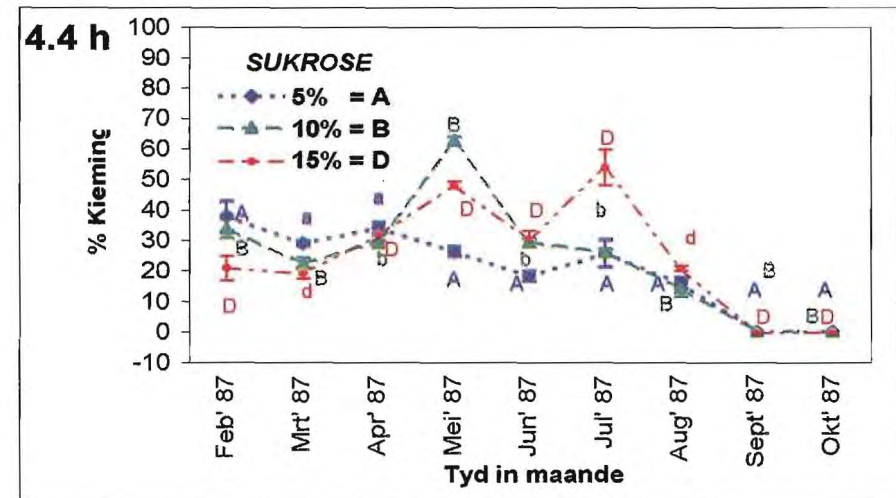
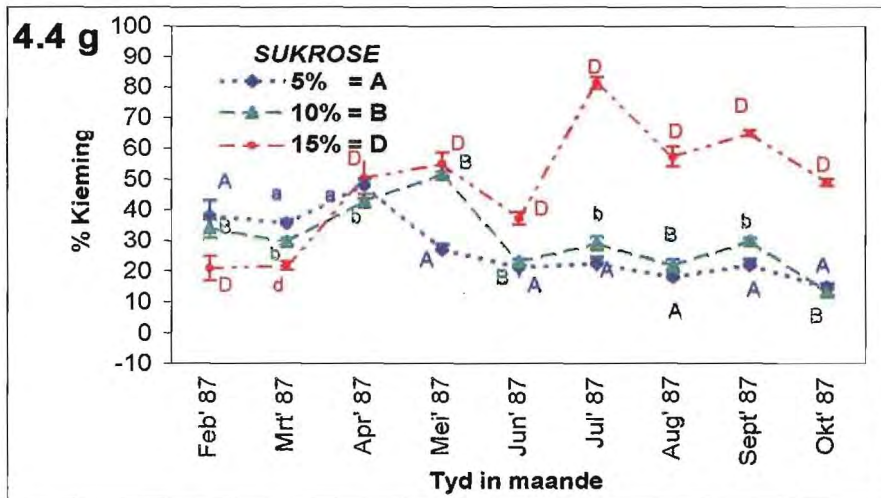
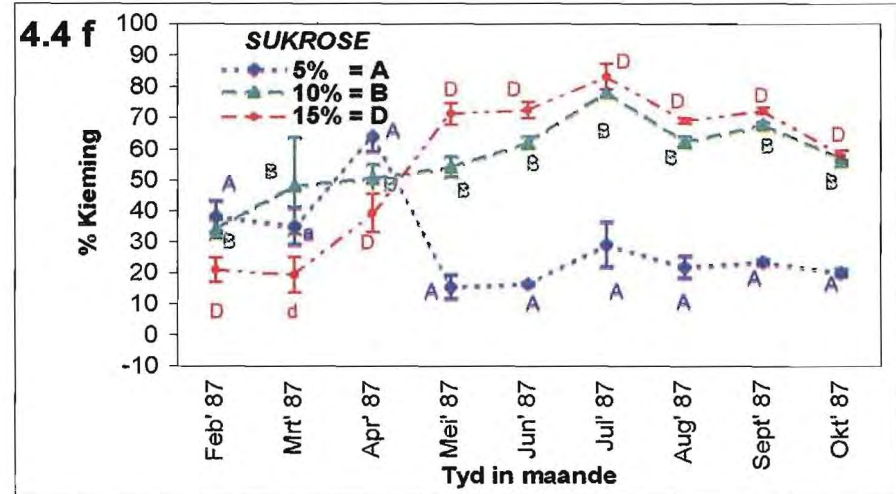
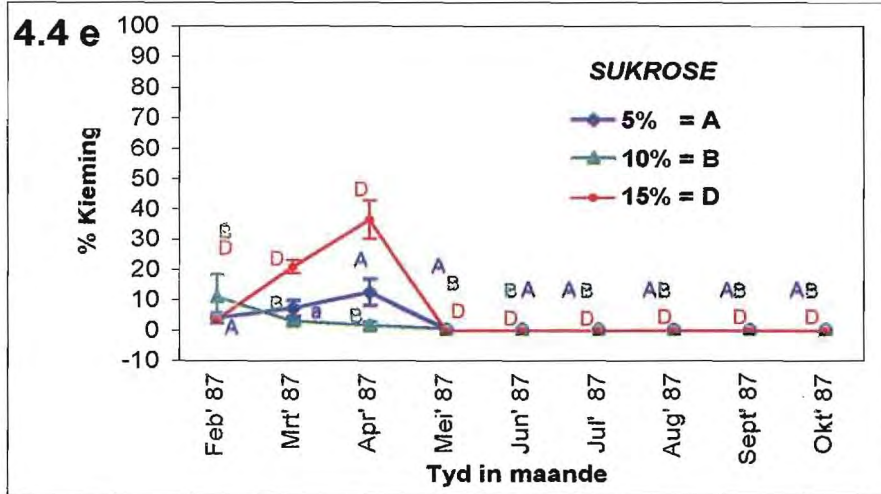
Figuur 4.4 Perssentasie kieming van *Encephalartos*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en wat by 5° C en beheerde RH geberg is.

e: *E. ferox*-stuifmeel by 90% RH

f: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 20% RH

g: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 40% RH

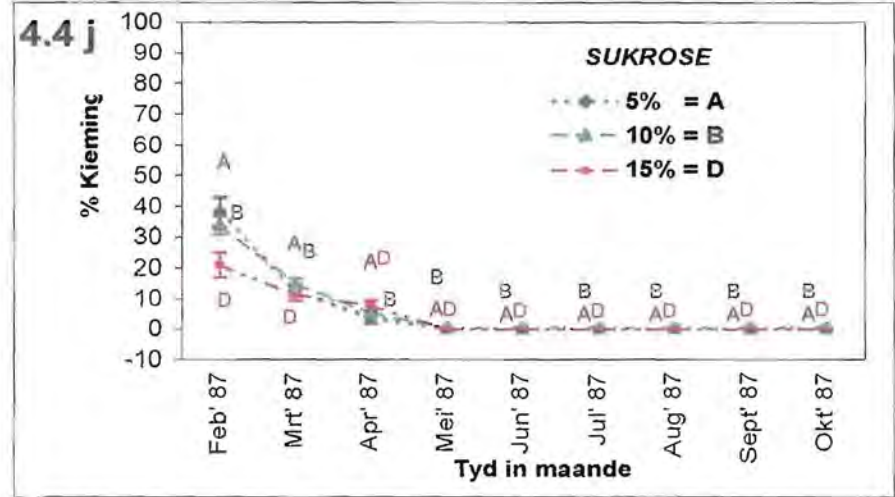
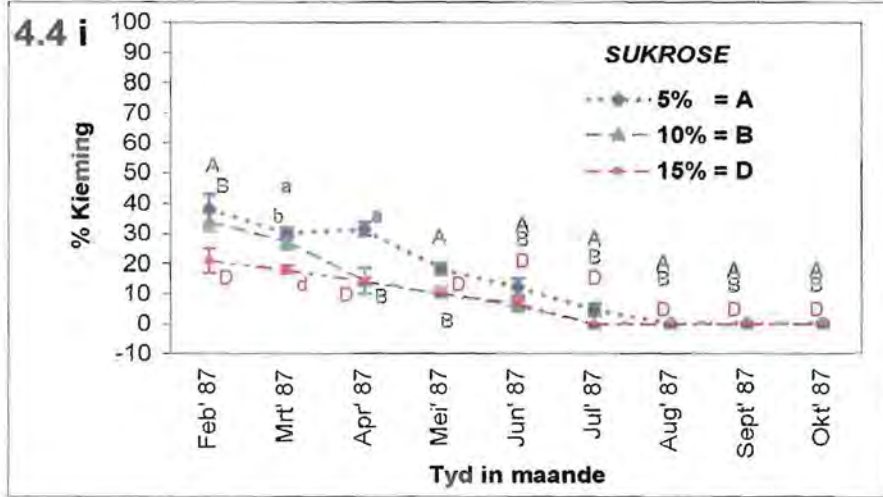
h: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 60% RH



Figuur 4.4 Persentasie kieming van *E. eugene-maraisii*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en by 5° C en beheerde RH geberg is.

i: 80% RH

j: 90% RH



Figuur 4.5 a: Persentasie kieming van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en by 25°

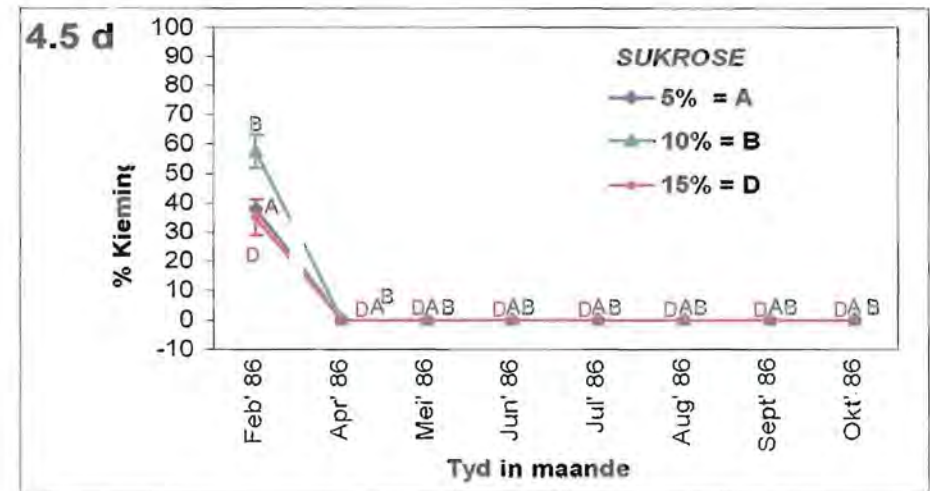
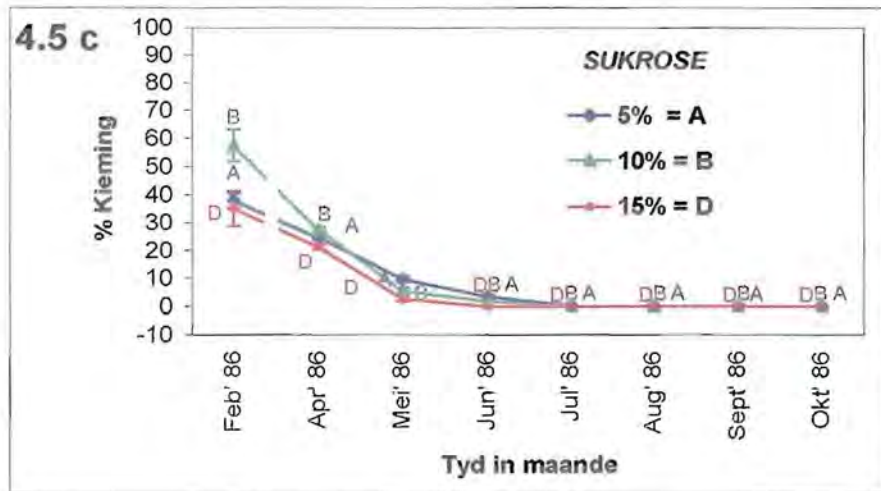
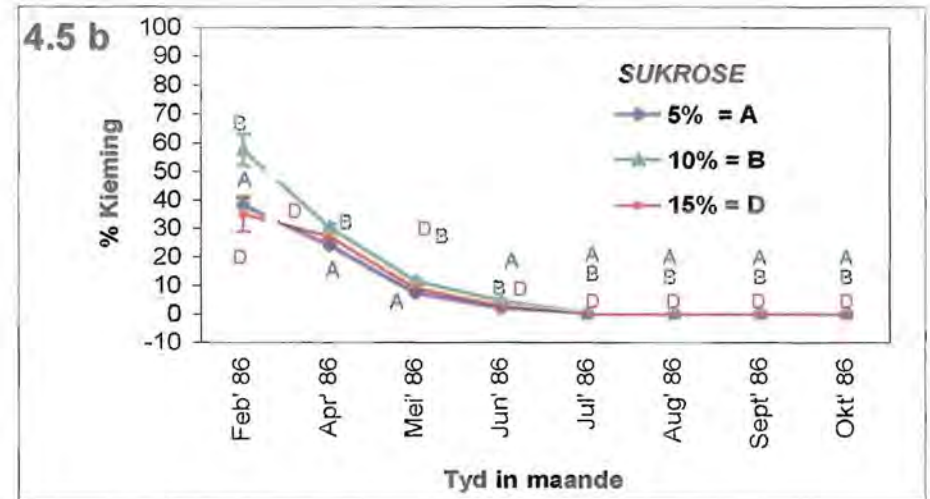
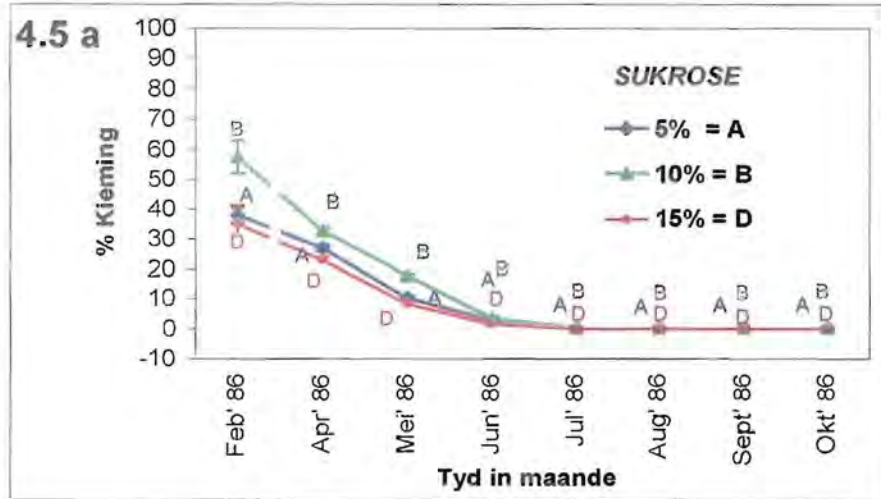
C en beheerde RH geberg is.

a: 20% RH

b: 40% RH

c: 60% RH

d: 80% RH



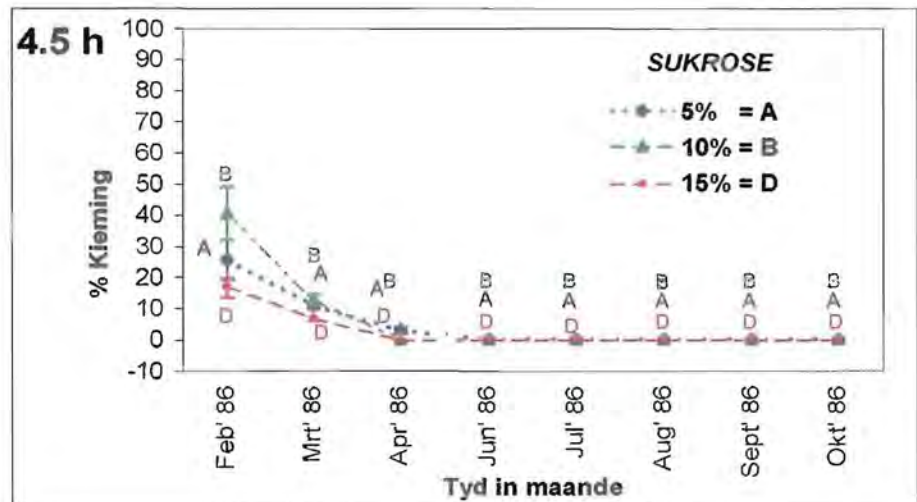
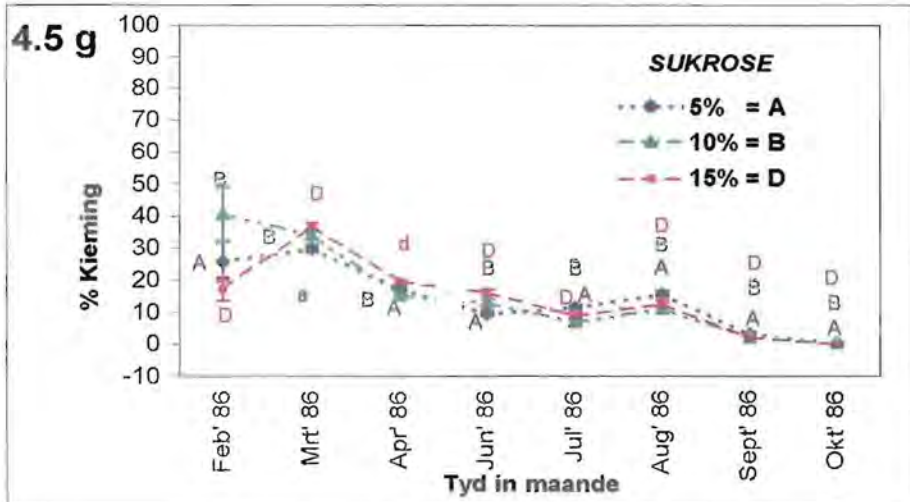
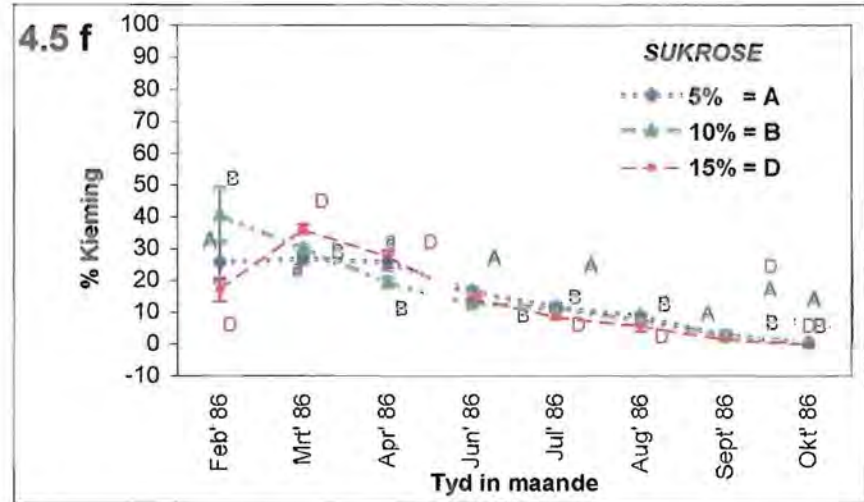
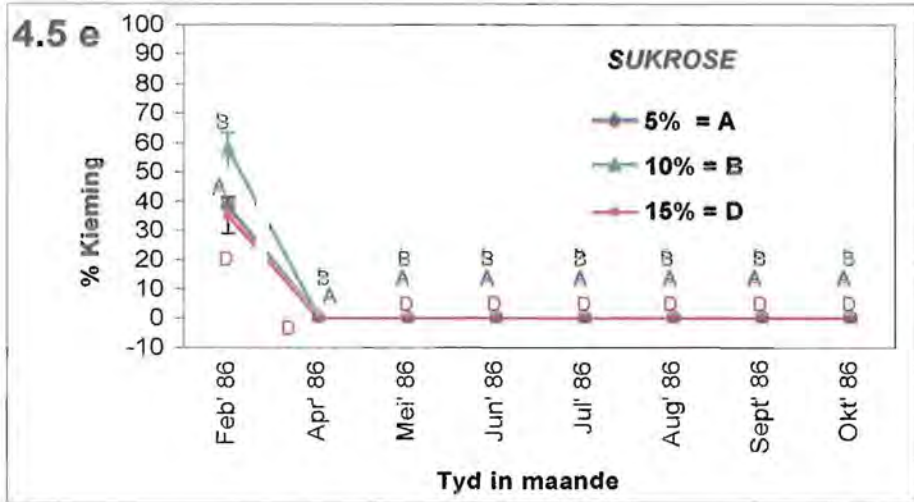
Figuur 4.5 Persentasie kieming van *Encephalartos*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en wat by 25° C en beheerde RH geberg is.

e: *E. ferox*-stuifmeel by 90% RH

f: *E. lehmannii*-stuifmeel by 20% en 25° C

g: *E. lehmannii*-stuifmeel by 40% RH

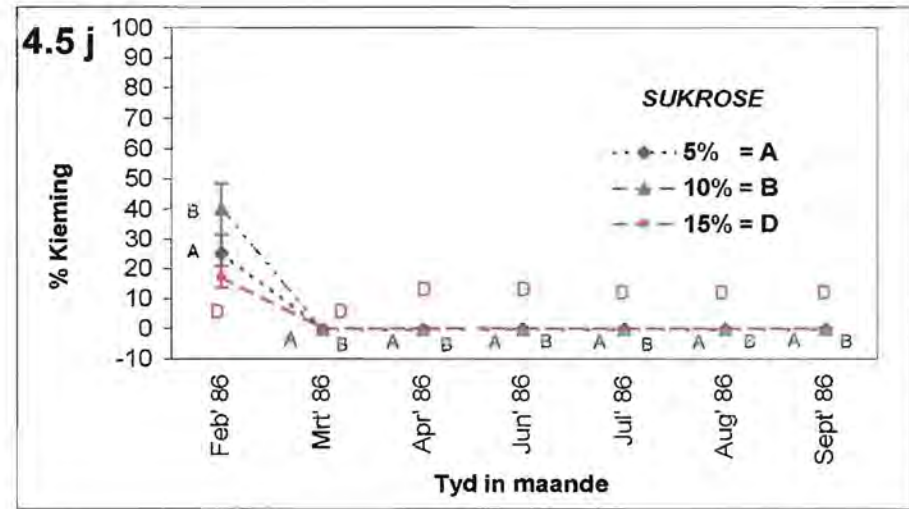
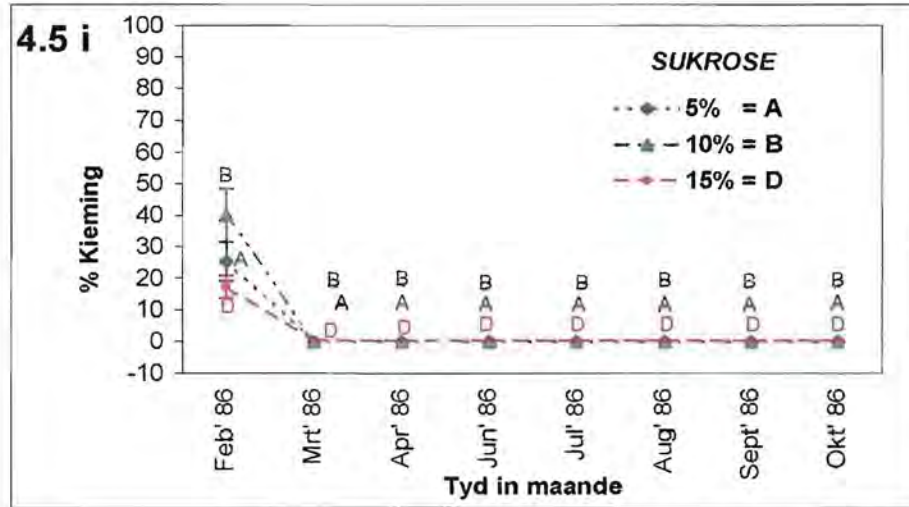
h: *E. lehmannii*-stuifmeel by 60% RH



Figuur 4.5 Persentasie kieming van *E. lehmannii*-stuifmeel wat in 1986 versamel is en by 25° C en beheerde RH geberg is.

i: 80% RH

j: 90% RH



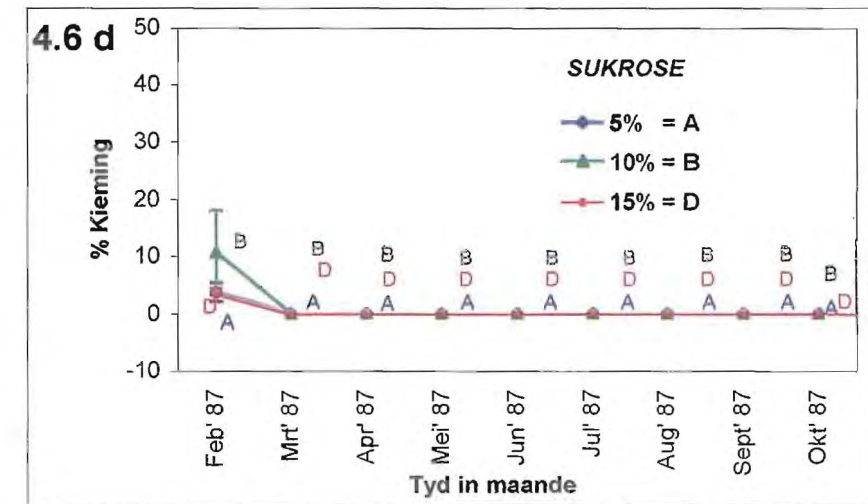
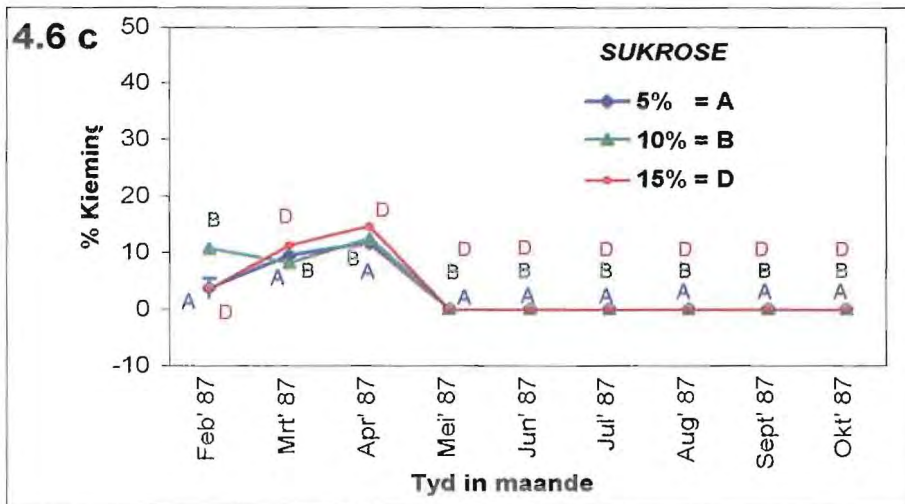
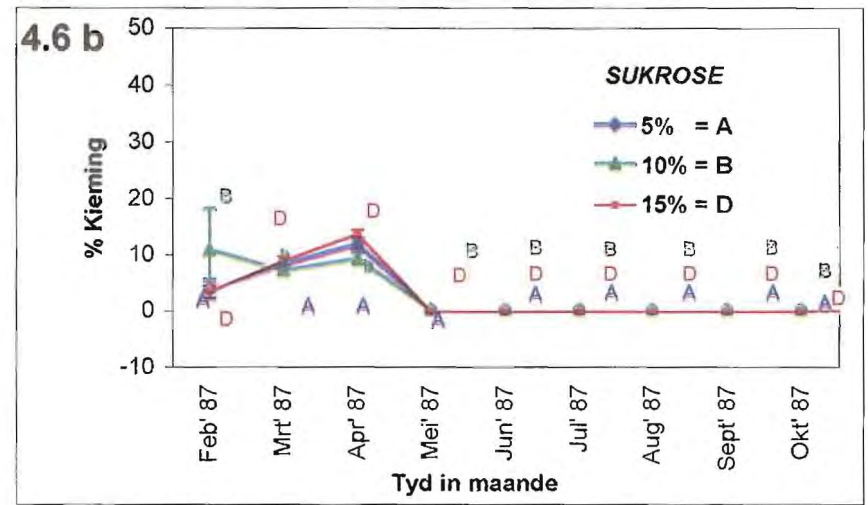
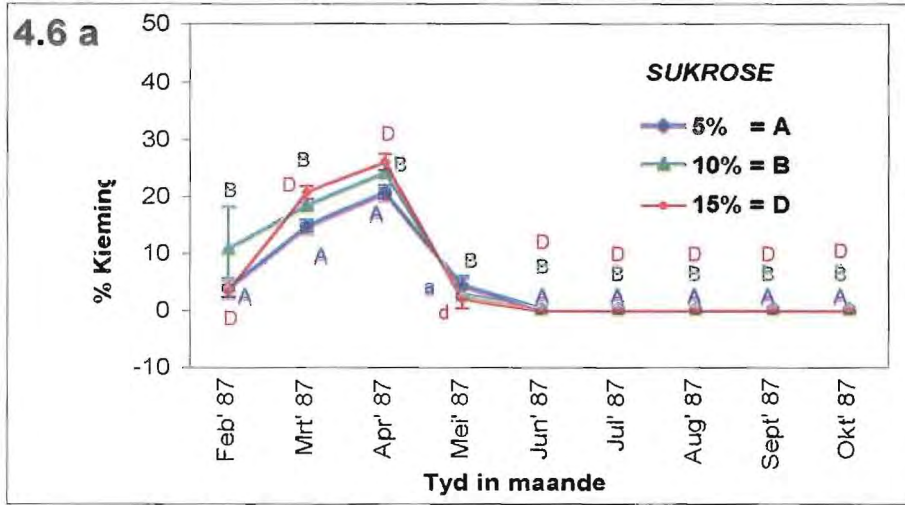
Figuur 4.6 Persentasie kieming van *E. ferox*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en by 25° C en beheerde RH geberg is.

a: 20% RH

b: 40% RH

c: 60% RH

d: 80% RH



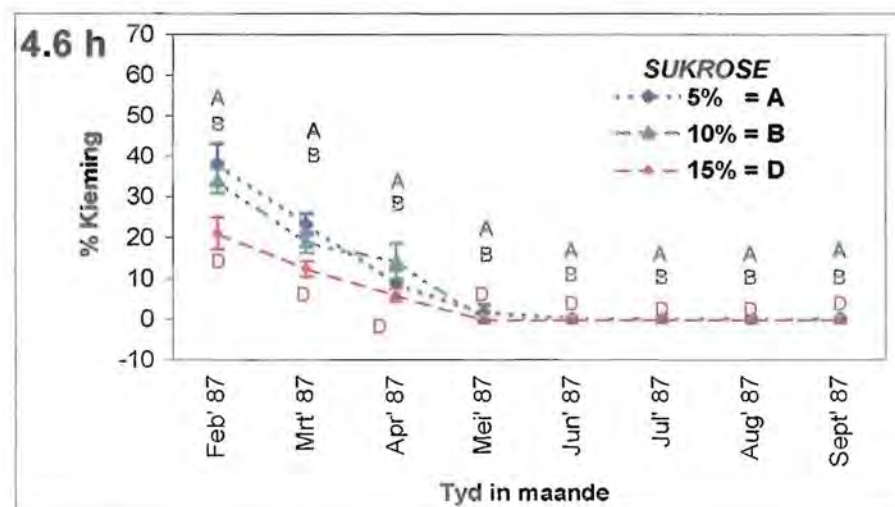
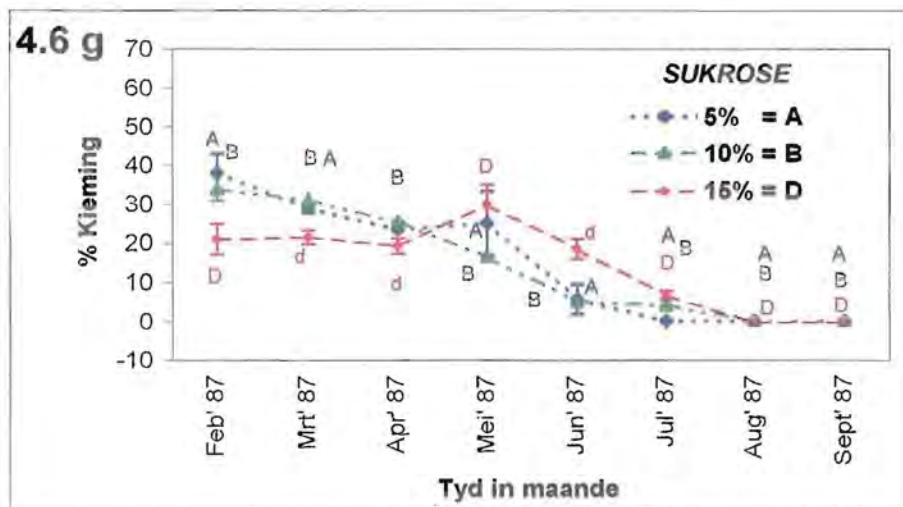
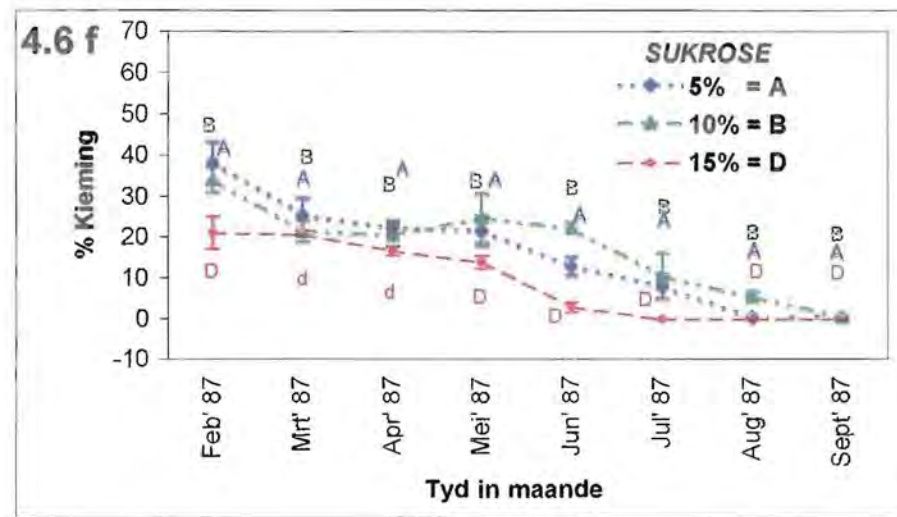
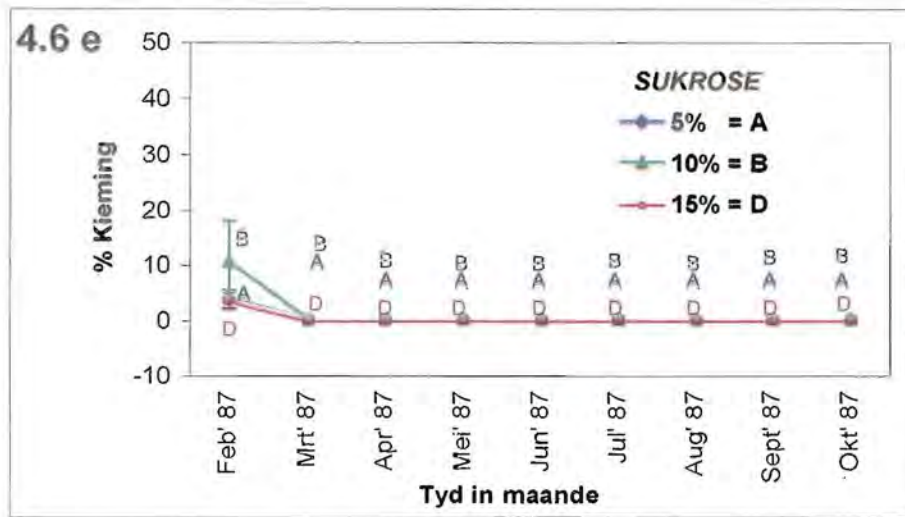
Figuur 4.6 Persentasie kieming van *Encephalartos*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en by 25° C en beheerde RH geberg is.

e: *E. ferox*-stuifmeel by 90% RH

f: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 20% RH

g: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 40% RH

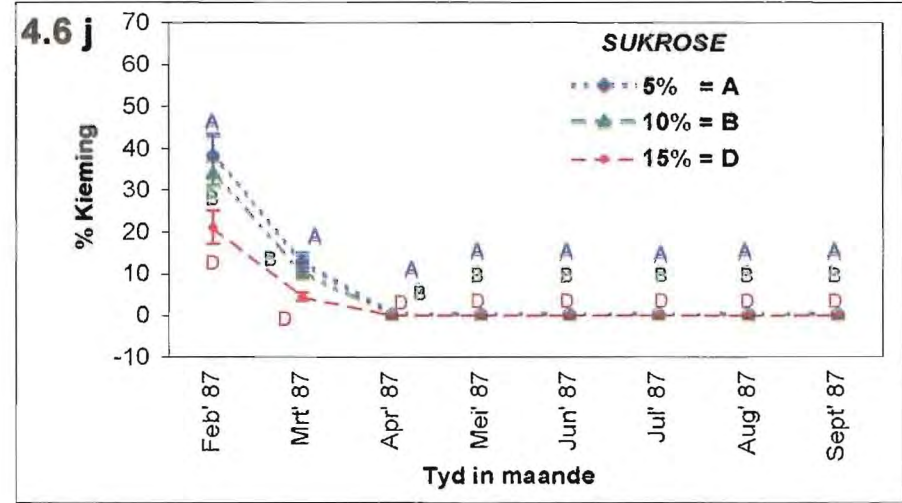
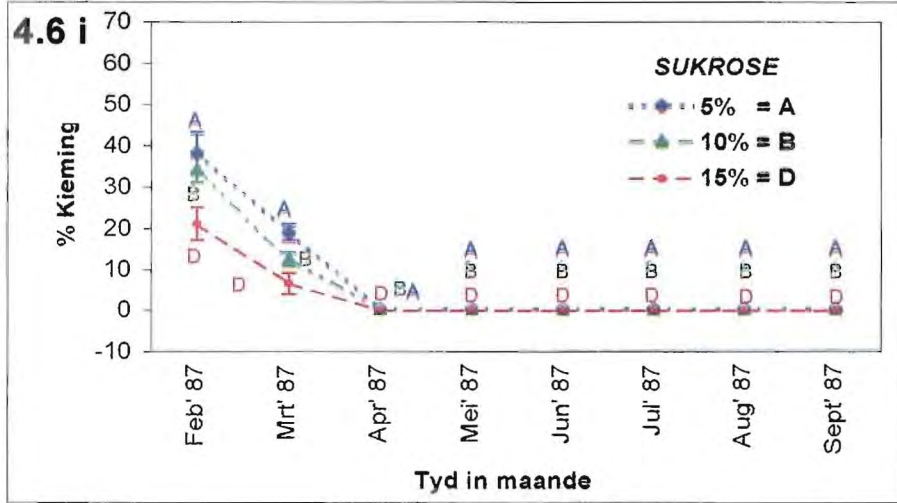
h: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel by 60% RH



Figuur 4.6 Persentasie kieming van *E. eugene-maraisii*-stuifmeel wat in 1987 versamel is en by 25° C en beheerde RH geberg is

i: 80% RH

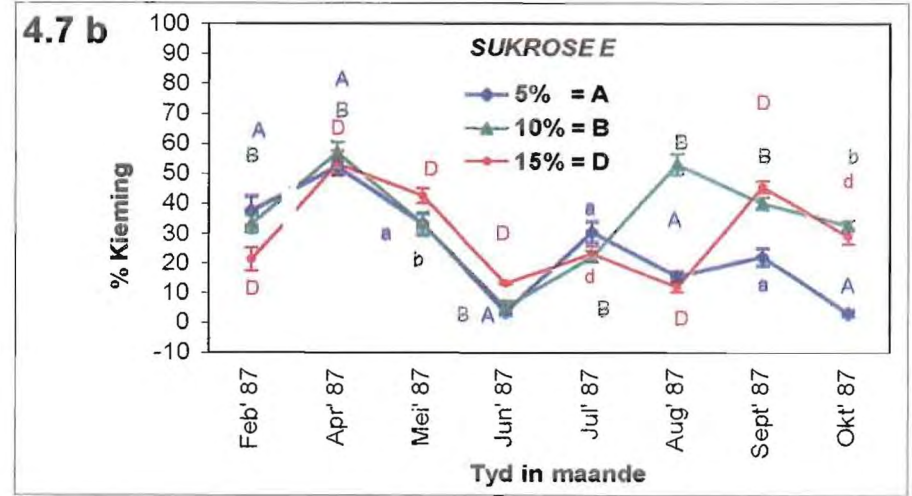
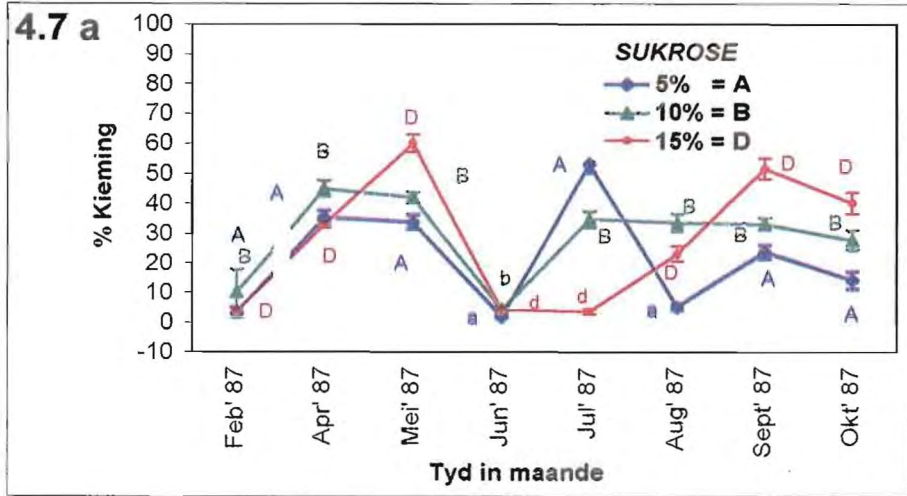
j: 90%



4.7 Persentasie kieming van twee *Encephalartos* spp se stuifmeel wat in vloeibare stikstof (-196° C) geberg is.

a: *E. ferox*

b: *E. eugene-maraisii*



Figuur 4.8 Persentasie kieming van *Encephalartos*-stuifmeel wat gevriesdroog is en daarna by verskillende temperature geberg is.

5° C

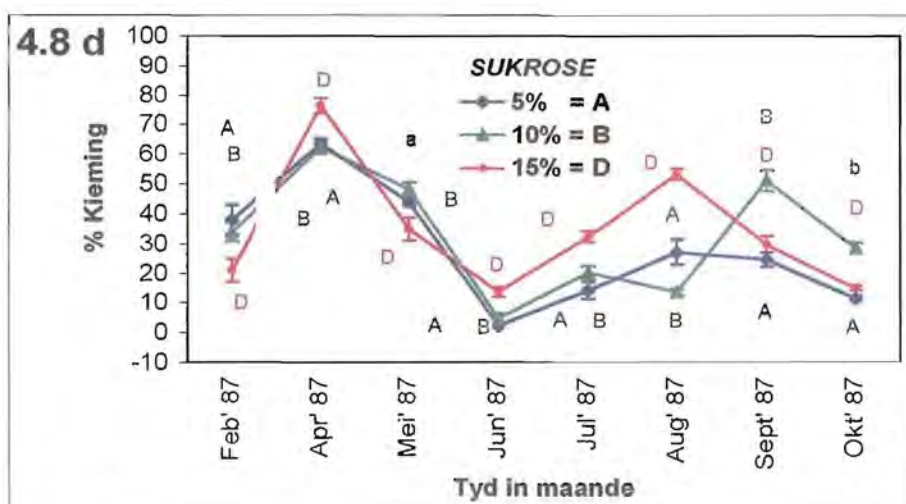
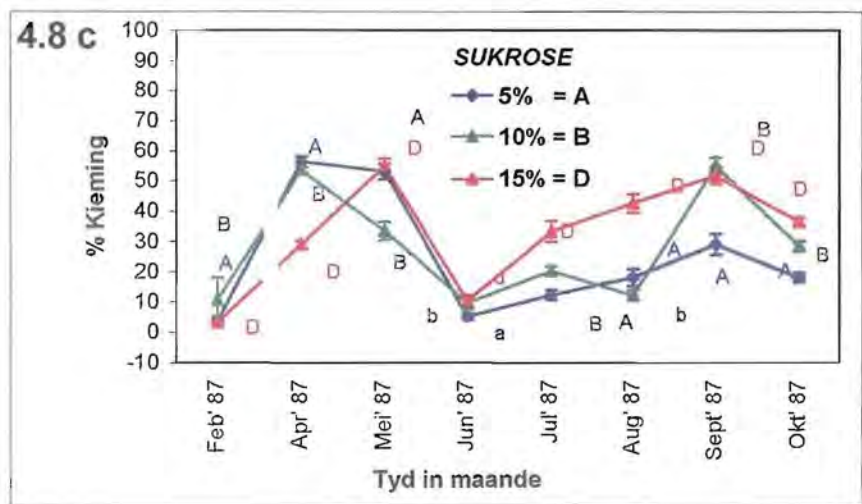
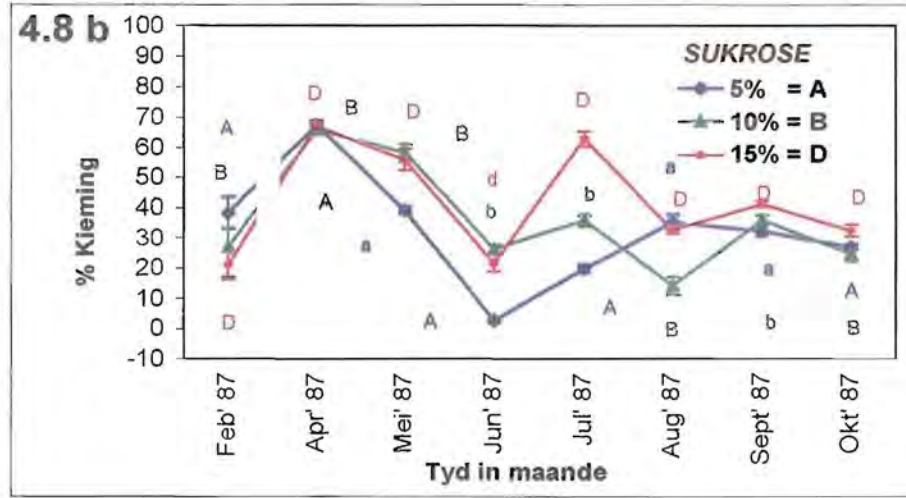
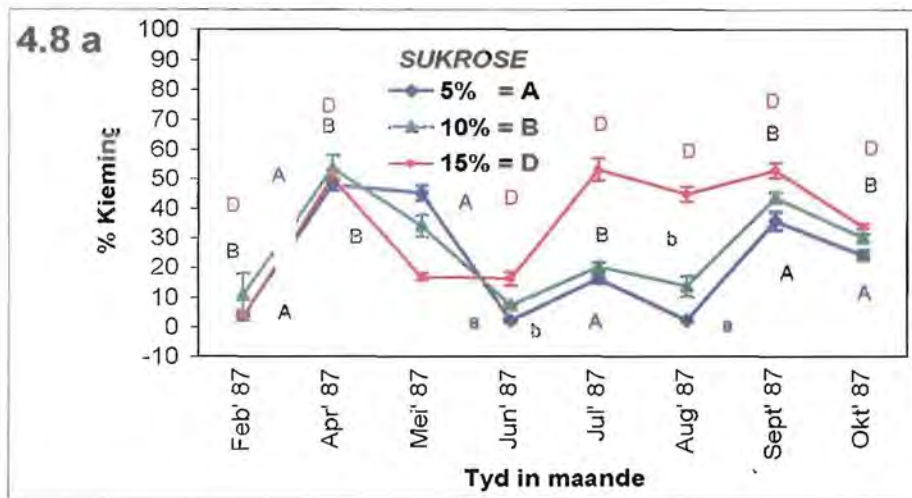
a: *E. ferox*-stuifmeel

b: *E. eugene-maraisii*

-25° C

c: *E. ferox*-stuifmeel

d: *E. eugene-maraisii*-stuifmeel



VERWYSINGS

- BALL, N.G. & DYKE, I.J. 1954. An endogenous 24-hour rhythm in the growth rate of the *Avena coleoptile*. *J. Exp. Bot.* 5: 421-433.
- 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.
- CHING, T.M. & CHING, K.K. 1964. Freeze-drying pine pollen. *Pl. Physiol.* 39: 705-709.
- 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.
- FIVAZ, J. & ROBBERTSE, P.J. 1993. *Pappea capensis*: Monoecious, dioecious or androdioecious. *S. Afr. J. Bot.* 59:342-344.
- KING, J.R. 1965. The storage of pollen particularly by the freeze-drying method. *Bull. Torrey bot. Club* 92: 270-287.
- LAYNE, R.E.C. & HAGEDORN, D.J. 1963. Effects of vacuum-drying, freeze-drying and storage environment on the viability of pea pollen. *Crop Sci.* 3: 433-436.
- MAGUIRE, T.L. & SEDGLEY, M. 1997. Storage-temperature affects viability of *Banksia menziesii* pollen. *Hort. Sci* 32: 916-917.
- OSBORNE, R., ROBBERTSE, P.J. & CLAASSEN, M.I. 1991. The longevity of cycad pollen: Results of some preliminary experimentation. *J. Cycad Soc. S.A.* 28: 10-13.
- OSBORNE, R. ROBBERTSE, P.J. & CLAASSEN, M.I. 1992. The longevity of cycad pollen in storage. *S. Afr. J. Bot.* 58: 250-254.

- ROCKLAND, L.B. 1960. Saturated salt solutions for the static control of relative humidity between 5° and 40° C. *Analytical chemistry* 32: 1375-1376.
- RODRIGUEZ-GARAY, B. & BARROW, J.R. 1986. Short-term storage of cotton pollen. *Pl. Cell Rep.* 5: 332-333.
- SHIVANNA, K.R. & JOHRI, B.M. 1985. The angiosperm pollen: Structure and function. Wiley Eastern limited. New Delhi, Bangalore, Bombay, Calcutta, Madras, Hyderabad.
- SHUKLA, P. & SHUKLA, A.C. 1983. Endogenous rhythm and hormonal response patterns in pollen germination and tube elongation in *Abelmoschus esculentus*. *Acta Horticulturae* 134: 109-110.
- STANLEY, R.G. & LINSKENS, H.F. 1974. Pollen: Biology, Biochemistry, Management. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- TYAGI, A., CONSIDINE, J. & McCOMB, J. 1992. Germination of *Verticordia* pollen after storage at different temperatures. *Aust. J. Bot.* 40: 151-155.
- VAUGHTON, G. 1991. Variation between years in pollen and nutrient limitation of fruit-set in *Banksia spinulosa*. *J. Ecol.* 78: 389-400.
- VAN DER WALT, I.D. & LITTLEJOHN, G.M. 1996. Storage and viability testing Protea pollen. *J. Am. Soc. Hort. Sc.* 121:804-809.
- WEATHERHEAD, M.A., GROUT, B.W.W. & HENSHAW, G.G. 1978. Advantages of storage of potato pollen in liquid nitrogen. *Potato Res.* 21: 331-334.
- WINSTON, P.W. & BATES, D.H. 1960. Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41: 232-237.

HOOFSTUK 5

FYNSTRUKTUUR VAN *ENCEPHALARTOS*-STUIFMEEL TYDENS BERGING

- * INLEIDING
- * MATERIAAL EN METODE
- * RESULTATE EN BESPREKING
- * SAMEVATTING
- * FIGURE
- * VERWYSINGS



INLEIDING

Die variasie in kiemkragtigheid gedurende die eksperimentele periode, die variasie in kiemingsbepalings in verskillende sukrose-kiemingsmediums en die probleem om geskikte kleuringstegnieke te vind om lewenskragtigheid by hierdie stuifmeel te bepaal, het vroe laat ontstaan soos 1) hoe verander die ultrastruktuur van so 'n stuifmeelkorrel tydens berging en veroudering en 2) is daar spesifieke organiese stowwe teenwoordig in die stuifmeelkorrel wat berging van hierdie soort stuifmeel sal kan bevorder of benadeel

Die struktuur van die eksien van die volgende mikrospore van die orde Cycadales is reeds bekend; *Dioon*, *Stangeria*, *Zamia*, *Encephalartos*, *Ceratozamia* en *Cycas* (Audran 1965; Audran & Masure 1976; Audran & Masure 1978; Audran 1980 & Gullvåg 1966). Verder is daar studies wat handel oor die ontwikkeling van die mikrospore vanaf die mikrospoor=moedersel totdat die mikrospoor volwasse is en vrygestel word (Aldrich & Vasil 1970; Audran 1971; Audran 1974; Audran 1978; Audran 1979; Audran 1981 & Rodkiewicz *et al.* 1988). Min inligting aangaande die verandering binne *Encephalartos*-stuifmeel tydens berging is egter bekend. Hierdie situasie is moontlik toe te skryf aan die feit dat dit algemeen bekend is dat die voorbereiding van materiaal vir TEM ondersoek van volwasse stuifmeel van die meeste Gymnospermae moeilik is. Die werk wat tot op hede in die verband gepubliseer is oor Cycadales-stuifmeel, konsentreer op die ontwikkeling van die stuifmeelkorrel in die mikrosporangium (Vasil & Aldrich 1970, Audran 1979, Audran 1981) en die eksien-skulptuur van die stuifmeelkorrel self (Audran 1965, Gullvåg 1966, Audran & Masure 1976, Planderová 1976, Audran & Masure 1978, Audran 1980, Audran 1981).

In hierdie studie is vars stuifmeel wat pas vanuit die keël vrygestel is, gebruik as vertrekpunt om vas te stel wat die invloed van berging op die ultrastruktuur is.

Die probleem wat met standaardvoorbereidings-metodes van *Encephalartos*-stuifmeel vir TEM studies geassosieer word, is dat die materiaal fragmenteer tydens die snyproses. Die oplossing wat tradisioneel voorgestel word, is die verlenging van die infiltrasietyd, maar Van der Merwe & Coetzee (1992) beweer dat sekere epoksies te sag is vir botaniese gebruik en stel voor dat die komponente van die hars wat moet infiltreer, varieer moet word om die hardheid van die hars te bevorder. Nog 'n moontlike rede vir swak snitte is die gebruik van glutaaraldehyd by kamertemperatuur of by 5° C vir die fiksering van stuifmeel wat lei tot onvolledige primêre fiksering (Van der Merwe & Coetzee 1985). Dit is as gevolg van die fikseermiddel wat stadig penetreer en die temperatuur wat onvoldoende is vir die volledige kruisbinding van proteïene in *Encephalartos*-stuifmeel. Materiaal wat op hierdie wyse ingebed is, fragmenteer gedurende die mikrotomering van die monster. Die resultaat is dat geen strukture van die stuifmeelkorrel met die TEM waargeneem kan word nie.

Materiaal en Metode

Natuurlik-vrygestelde stuifmeel van manlike keëls van vier *Encephalartos*-spesies, naamlik *E. altensteinii* Lehm., *E. eugene-maraisii* Verdoorn, *E. ferox* Bertol. f. en *E. lehmannii* Lehm. is op velle skoon bruinpapier versamel. Stuifmeelmonsters is in sentrifugeerbuis geplaas om vloeistowwe tussen die verskillende stappe maklik deur middel van 'n pasteurpipet te verwyder nadat dit vir vyf minute gesentrifugeer is by 600g.

Die monsters is vooraf behandel met 0,1% sellulase (Sigma Chemical Co., Practical Grade) in 0,1M sitraatbuffer by 'n pH van 4,4 vir 2 ure by 28° C. Hierna is die monsters drie keer gewas in 0,1M fosfaatbuffer (pH 7,2). Primêre fiksering het in 2,5% herdistilleerde glutaaraldehyd oplossing in 'n 0,1M fosfaatbuffer (pH 7,2) met 0,5% kafeïen vir aanvanklik

30 minute by 20°C en daarna vir 48 uur by 60° C, geskied. Die materiaal is drie keer vir 10 minute in 0,1 M fosfaatbuffer gewas voordat postfiksering in 0,5% waterige OsO₄ vir 48 uur by 60° C uitgevoer is. Dehidrasie van die materiaal het in 'n asetoon reeks plaasgevind. Die materiaal is in 'n Quetol 651 mengsel ingebed wat aangepas is van die oorspronklike formule (Kushida 1974) deur die anhidried-epoksie samestelling te varieer (Van der Merwe & Coetzee 1986, 1992). Dun sneë is met diamant- of glasmesse gesny. Kontras is verkry deur die sneë met loodsitraat (Reynolds 1963) en 4% waterige uranielasetaat te kontrasteer. Karve & Kulkarni (1989) beveel aan dat sneë met 5% uranielasetaat by 50°C vir 15 minute gekontrasteer word. In hierdie studie was dit nie nodig nie, aangesien die organelle reeds genoegsaam gekontrasteer was. Kafeïen is lank reeds gebruik in ligmikroskoopstudies waar tanniene in selle voorkom, aangesien die kafeïen vinnig die sel binnedring en dit ook nie giftig is nie (Mueller & Greenwood 1978). Mueller & Greenwood (1978) beskryf die gebruik van kafeïen saam met glutaaraldehyd om selle wat fenoliese stowwe bevat, te fikseer. Kafeïen in hierdie geval help voorkom dat die fenoliese stowwe uit die vakuole deur die tonoplast in die sitoplasma in beweeg.

Resultate en Bespreking

Fiksering in glutaaraldehyd wat kafeïen bevat by 'n temperatuur van 60° C, vir langer periodes, het optimale fiksering tot gevolg gehad en het baie goeie resultate met *Encephalartos*-stuiwmeel gelewer.

Die seksien kan maklik deurgesny word met min verbrokkeling van die weefsel (Figuur 5.1). Die ultrastrukturele bou van sitoplasmiese organelle soos die nukleus en die mitochondrium was genoegsaam gepreserveer. Selfs die membrane het die karakteristieke trilaminêre struktuur met die aldehyd- en osmiumfiksering getoon.

Die ontwikkeling van 'n suksesvolle voorbereidingsmetode het dit moontlik gemaak om indringend te kyk na die ultrastrukturele veranderinge wat in *Encephalartos*-stuifmeel plaasvind gedurende berging. In hierdie bespreking word gehou by die stuifmeel-nomenklatuur soos beskryf is volgens Erdtman in 1966 (Audran & Masure 1976). Volgens hierdie nomenklatuur kan die eksien van 'n stuifmeelkorrel in die seksien en die neksien verdeel word en die seksien verdeel word in 'n ekto- en endoseksien. 'n Stuifmeelkorrel by *Encephalartos* spp. bestaan dan hoofsaaklik uit drie dele, naamlik die seksien, neksien en intien (Audran & Masure 1978). Die eksien is saamgestel uit weerstandbiedende sporopollenien wat osmiofiliese eienskappe toon (Audran 1979). Sporopollenien is by Gymnospermae deur verskeie navorsers ondersoek (Vasil & Aldrich 1970; Audran 1981).

Volgens Audran (1981) word kallose progressief en selektief afgebreek wanneer die mikrospore gereed is om uit die tetraspoor vrygestel te word. Die stelselmatige afbreek van die hemisellulose dele van sporangiumwandselle veroorsaak dat die mikrospore vrygestel word vanuit die sporangium. Tydens hierdie vrystellingsfase is die eksien van die stuifmeelkorrel reeds volledig gevorm (Audran 1981). Audran (1971) beskryf by *Ceratozamia mexicana* 'n sisteem wat outofagiese funksies besit in die primêre sporogene selle gedurende hulle fase van vermeerdering. Hieruit lei hy af en gee 'n skets hoe hierdie outofagie die sitoplasma of die membrane degenereer.

'n Duidelike seksien en neksien kan waargeneem word en die intien is in lewenskragtige stuifmeelkorrels teenaan die neksien geleë (Figuur 5.2). In Figuur 5.3 begin die eksien wegtrek van die intien. Southworth (1988) beweer dat die eksien van die intien gedurende die proses van hidrasie tydens stuifmeelkieming spontaan wegtrek by sekere gymnosperme

beweer verder dat geïsoleerde eksienlae vir chemiese ontleding gebruik kan word, veral in die geval van sporopollenien.

Sommige stuifmeelkorrels van *E. ferox* wat vir vyf maande (150 dae) geberg is, toon geen wegtrek van die lae nie en toon nog steeds opeenvolgende lae aan mekaar. Die selstrukture soos die mitochondriums, vakuole en amiloplaste is baie duidelik (Figuur 5.4). Die deurgesnyde stuifmeelkorrels toon baie lipieddruppels en die metode van Van der Merwe & Coetzee (1984) by olierige sade het heelwat lig op die studie gewerp. Amiloplaste kom ook volop voor in die stuifmeelkorrels.

Die afbreek van die periplasma (intien) is ook by *E. eugene-maraisii*-, *E. altensteinnii*- en *E. lehmannii* stuifmeelkorrels waargeneem (Figuur 5.5, 5.6 & 5.7). Die ouderdom van die stuifmeelkorrels kan nie as 'n maatstaf vir die wegskeur van die eksien gebruik word nie. Figuur 5.7 bevestig die feit dat daar wel van die intien tot niet gaan en dat die verskynsel nie net die wegskeur van materiaal tydens die sny daarvan is nie aangesien daar in die figuur dele van die intien nog steeds aan die buissel en generatiewe sel van die geheg is. Figuur 5.7 dui drie stuifmeelkorrels van *E. lehmannii* nadat dit vir vier maande (120 dae) by 5° C geberg is aan. A se wande is behoue maar, B en C se eksien trek duidelik weg van die intien af.

Wanneer die intien van die stuifmeelkorrels begin degenerereer, kan die stuifmeelkorrel nie meer kiemkrachtig beskou word nie. Geen outofagie kon egter waargeneem word nie en verdere studie moet op die aspek gedoen word.

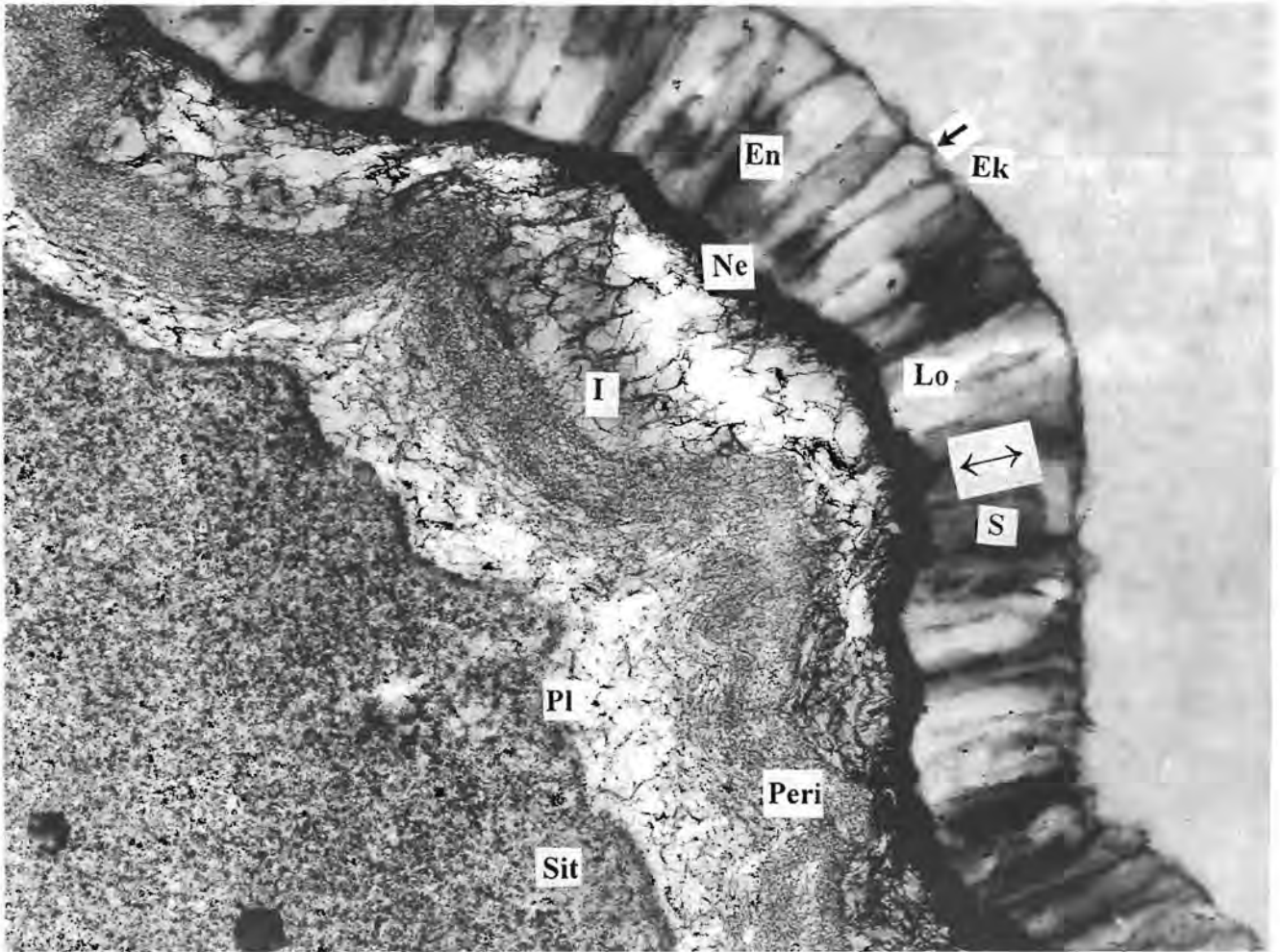
Stuifmeelkorrels het na berging by 5° C, binne 'n maand die aftakeling van die sitoplasma begin toon en waar die stuifmeelkorrel geen agteruitgang getoon het nie kan dit 'n moontlike voorspelling gee van die kiemkragtigheid van die stuifmeelkorrel. Om so 'n bevinding te staaf verg 'n groot hoeveelheid stuifmeel en baie TEM werk wat gedoen moet word. Dit was nie die doel van die studie nie.

Samevatting

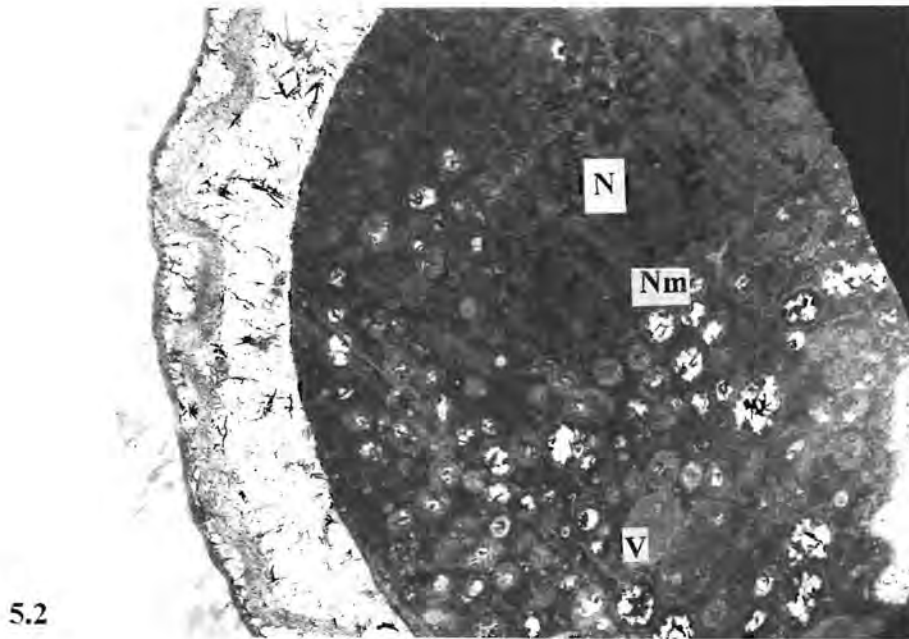
Die tot niet gaan van 'n deel van die intien dui moontlike veroudering en verlies van kiemkragtigheid in die stuifmeelkorrel aan. Korrelasietoetse tussen die aantal stuifmeelkorrels onder TEM wat die wegtrek verskynsel toon en *in vitro* kiemingstoetse se kiemingspersentasies kan moontlik meer lig werp of die stuifmeelkorrels nog kiemkragtig is. In hierdie studie kom dit duidelik te voorskyn dat die wegtrek van die eksien, of die moontlike degenerering van die intien nie net toegeskryf kan word aan ouderdom van die stuifmeel nie, maar, miskien moontlik veroorsaak word deur 'n algemene aftakeling van die sitoplasma wat uiteindelik lei tot die waargenome verlies van kiemkragtigheid of lewenskragtigheid van die stuifmeelkorrel self.

FIGUURBLAD

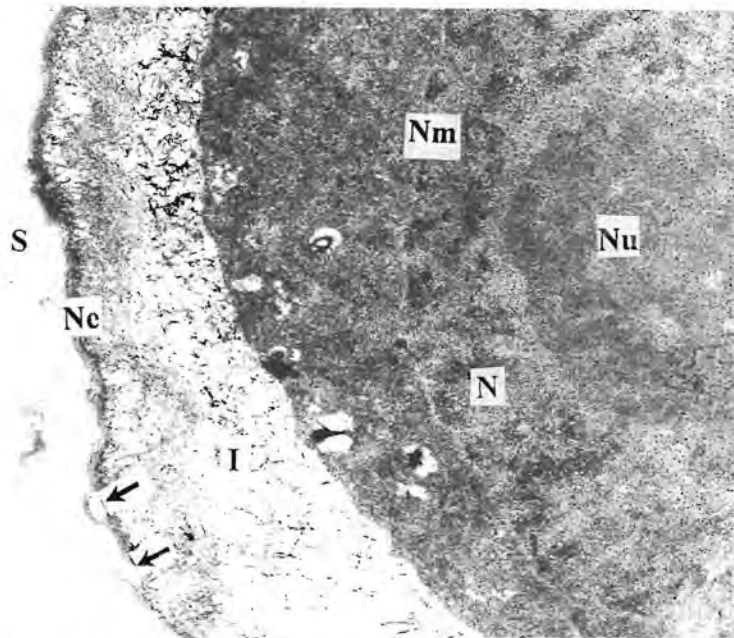




Figuur 5.1 Elektronmikrograaf van 'n gedeelte van 'n stuifmeelkorrel van *E. lehmanna* na sellulase en kafeïenbehandeling en fiksering by 60° C. Wandstrukture is nog intak en sitoplasmiese ultrastrukture is gepreserveer. $\times 37000$. Ek.- ektoseksien, En.- endoseksien, I.- intien, Lo.- lobule, Ne.- neksien, Peri.- periplasma, Pl.- plasmalemma, S.- seksien, Sit.- sitoplasma.



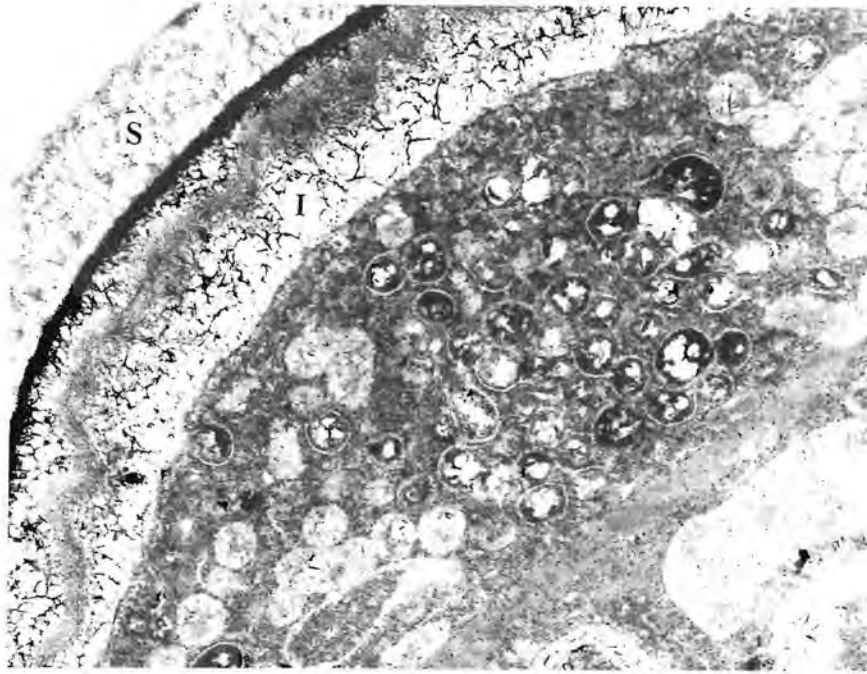
5.2



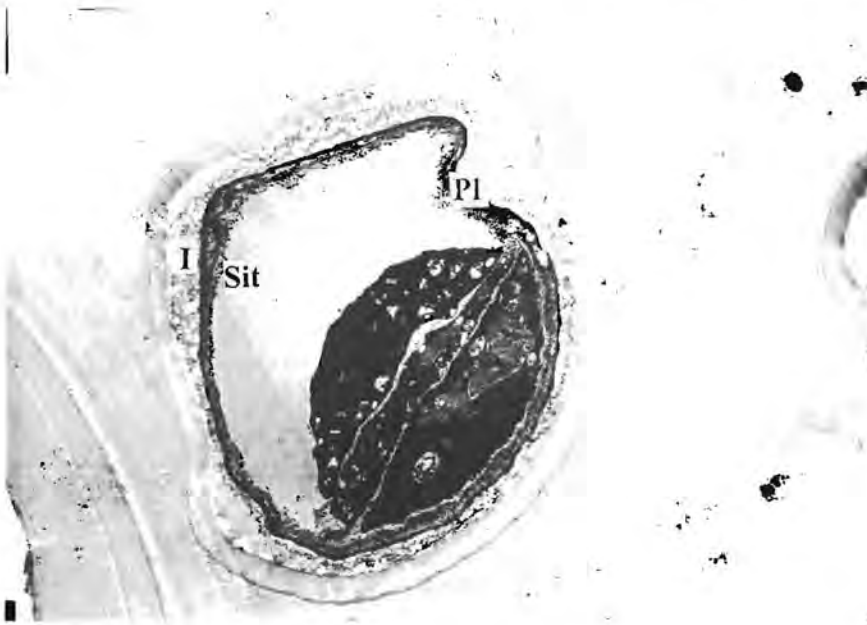
5.3

Figuur 5.2, 5.3 5.2 Mikrograaf van 'n *E. ferox*-stuifneelkorrel wat vir 56 dae geberg is by 5° C. Duidelike selstrukture en intakte intien. ×7500 5.3 Mikrograaf van *E. ferox*-stuifneelkorrel wat vir 30 dae by 5° C geberg is. Seksien en neksien trek plek-plek van mekaar af (Pyltjies wys die posisie aan). ×9800. I.- intien, N.- nukleus, Ne.- neksien, Nm.- nukleusmembraan, Nu.- nukleolus, S.- seksien, V.- vakuool.

5.4

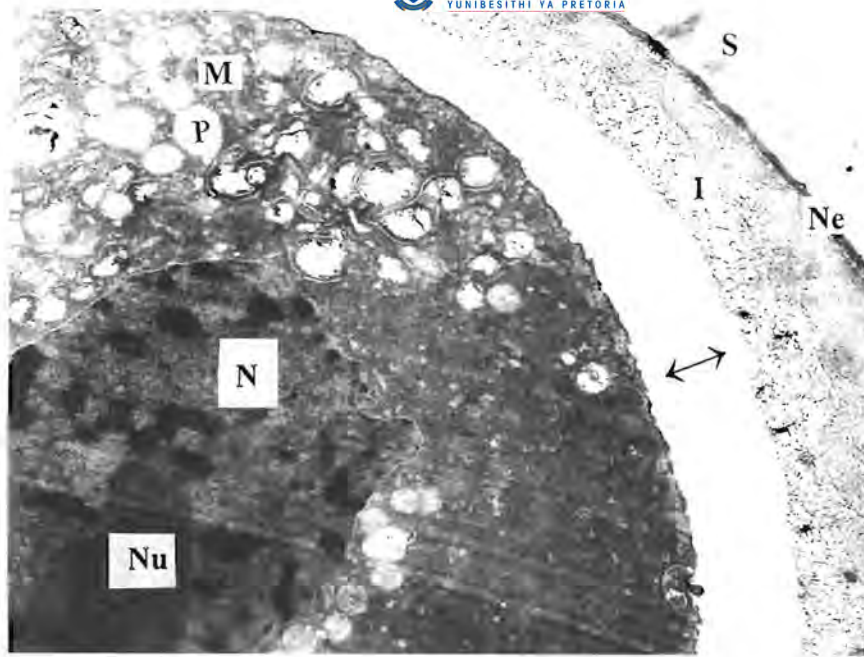


5.5

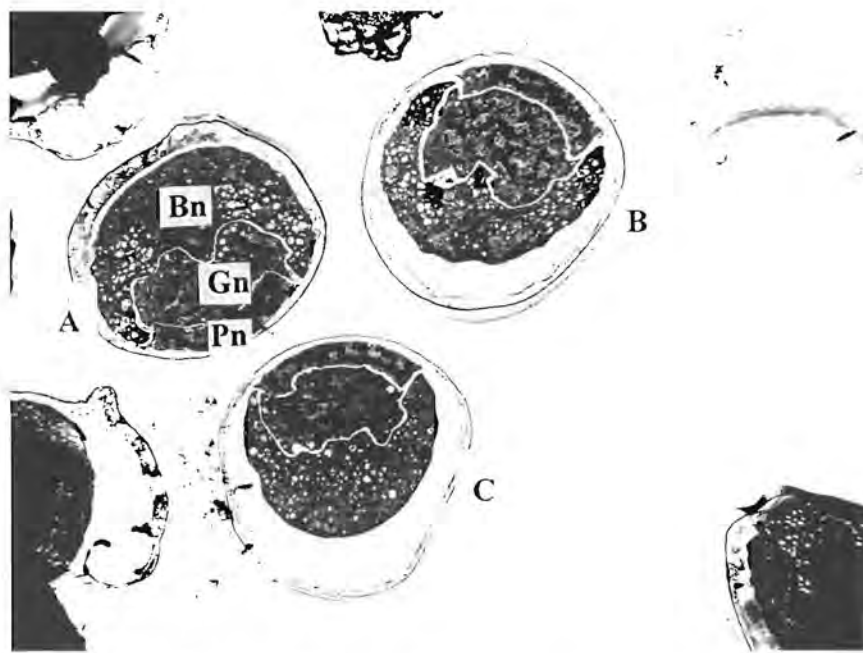


Figuur 5.4, 5.5 5.4 'n Mikrograaf van 'n *E. ferox*-stuifmeelkorrel wat vir 164 dae by 5° C geberg is. Selstrukture duidelik. Alle wande intak. × 9800 5.5 'n Mikrograaf van 'n stuifmeelkorrel van *E. eugene-maraisii* wat die totale degenerasie van sitoplasma beklemtoon. Hierdie stuifmeel is vir 181 dae by 5° C geberg. × 360. I.- intien, Pl.- plasmalemma, S.- seksien, Sit.- sitoplasma.

5.6



5.7



Figuur 5.6, 5.7 5.6 'n Mikrograaf van 'n stuifmeelkorrel van *E. altensteinnii* wat die moontlike afbreek van sitoplasma beklemtoon. Hierdie stuifmeel is vir 122 dae geberg by 5° C. × 9500. 5.7 'n Mikrograaf van stuifmeelkorrels van *E. lehmannii*. Stuifmeelkorrel A kan nog as kiemkragtig beskou word. B en C kan nie meer as kiemkragtig beskou word nie. Stuifmeel is vir 122 dae by 5° C geberg. ×1200. Bn.- buisnukleus, Gn.- generatiewe nukleus, I.- intien, M. mitochondrium, N.- nukleus, Ne.- neksien, Nu.- nukleolus, P.- plastied, Pn.- protallium nukleus, S.- seksien.

VERWYSINGS

- ALDRICH, H.C. & VASIL, I.K. 1970. Ultrastructure of the postmeiotic nuclear envelope in microspores of *Podocarpus macrophyllus*. *J. Ultrastructure Research* 32: 307-315.
- AUDRAN, J-C. 1965. Contribution a l'étude de la structure de la paroi du grain de pollen chez *Dioon*, *Stangeria*, *Ceratozamia*, *Cycas* et *Encephalartos*. *Ann. Univ. et de l'A.R.E.R.S.* 3: 130-144.
- AUDRAN, J-C. 1971. Contribution a l'étude de la microsprogenese chez les Cycadales: sur la presence de systemes a fonctions Autophagiques dans les cellules-meres primordiales durant leur phase de multiplication chez le *Ceratozamia mexicana* (Cycadales). *Ann. Univ. et de l'A.R.E.R.S.* 9: 106-121.
- AUDRAN, J-C. 1974. Cytologie Végétale.-Aspects ultrastructuraux de l'individualisation des microspores du *Ceratozamia mexicana* (Cycadacées). *C. R. Acad. Sc. Paris, t.* 278:1023-1026.
- AUDRAN, J-C. 1978. Cytobiologie de la microsporogenèse, et du tapis chez le *Ceratozamia mexicana* (Cycadacées). *Ann. Univ. et de l'A.R.E.R.S. Reims* 15: 1-26.
- AUDRAN, J-C. 1979. Microspores, pollen and tapetum ontogeny in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceae): an ultrastructural study. *Phytomorphology* 29: 350-362.
- AUDRAN, J-C 1980. Morphogenese et alterations provoquées des exines des Cycadales: apports une meilleure interpretation de leur infrastructure. *Rev. Cytol. Biol. végét.-Bot.* 3: 311-353.
- AUDRAN, J-C. 1981. Pollen and tapetum development in *Ceratozamia mexicana* (Cycadaceae): Sporal origin of the exinic sporopollenin in cycads. *Rev. Pal. Palynol.* 33: 315-346.
- AUDRAN, J-C. & MASURE, E. 1976. Précisions sur l'infrastructure de l'exine chez les Cycadales (Prespermaphytes). *Pollen et Spores*: 18: 5-26.

- AUDRAN, J.-C. & MASURE, E. 1978. La sculpture et l'infrastructure du sporoderme de *Ginkgo biloba* comparées à celles des enveloppes polliniques des Cycadales. *Rev. Pal. Palynol.* 26: 363-387.
- GULLVÅG, B.M. 1966. The fine structure of some Gymnosperm pollen walls. *Grana Palynol.* 6: 435-475.
- KARVE, V. & KULKARNI, A.R. 1989. Ultrastructure of freshly released and hydrated pollen grains of *Ricinus communis* Linn. *Asia. J. Pl. Sci.* 1: 79-87.
- KUSHIDA, H. 1974. A new method for embedding with a low viscosity resin "Quetol 651". *J. Electron Microsc.* 23: 197-197.
- MUELLER, W.C., GREENWOOD, A.D. 1978. The ultrastructure of phenolic-storing cells fixed with caffeine. *J. Exp. Bot.* 29: 757-764.
- PLANDEROVÁ, E. 1976. Morphology of exine of some species of Pteridophyta and Gymnospermae pollen, examined under stereoscanning microscope. *Biologické Práce* 22: 45-161.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biology* 17: 208-212.
- RODKIEWICZ, B., BEDNARA, J., KURAS, M. & MOSTOWSKA, A. 1988. Organelles and cell walls of microsporocytes in a cycad *Stangeria* during meiosis I. *Phytomorphology* 38: 99-110.
- SOUTHWORTH, D. 1988. Isolation of exines from gymnosperm pollen. *Amer. J. Bot.* 75: 15-21.
- VAN DER MERWE, C.F. & COETZEE, J. 1984. Infiltrating oily seeds with epoxy resin. *Proc. Electron Microsc. Soc. South Afr.* 14: 77-78.
- VAN DER MERWE, C.F. & COETZEE, J. 1985. Penetration of glutaraldehyde in various buffers into plant tissue and gelatin gels. *J. Microscopy* 137: 129-136.

- VAN DER MERWE, C.F. & COETZEE, J. 1986. Resin hardness measurements as an aid to epoxy formulation. *Proc. Electron Microsc. Soc. South Afr.* 16: 137-138.
- VAN DER MERWE, C.F. & COETZEE, J. 1992. Quetol 651 for general use: a revised formulation. *Proc. Electron Microsc. Soc. S. Afr.* 22: 31-32.
- VASIL, I.K. & ALDRICH, H.C. 1970. A histochemical and ultrastructural study of the ontogeny and differentiation of pollen in *Podocarpus macrophyllus*. *Protoplasma* 71: 1-37.