

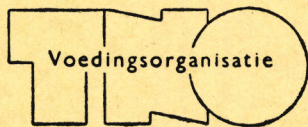
**INSTITUUT VOOR GRAAN, MEEL EN BROOD T.N.O.
TE WAGENINGEN**

MEDEDELING NR. 147

**VERSLAG VAN HET IN 1961
VERRICHTE ONDERZOEK AANGAANDE
KIEMRUST EN SCHOT**

DOOR

B. BELDEROK



Overdruk uit: Tienjarenplan voor Graanonderzoek
Verslag over het achtste jaar, p. 59-69

Verslag van het in 1961 verrichte onderzoek aangaande kiemrust en schot

A. LOKALISATIE VAN HET KIEMRUSTMECHANISME

Bij het onderzoek naar de fysiologische oorzaken van de kiemrust is het van groot belang te weten, in welke delen van de graankorrel het kiemrust-mechanisme gelokaliseerd is. Vele auteurs zijn van mening, dat de kiemrust moet worden toegeschreven aan eigenschappen van de wandlagen der korrels; meestal denkt men hierbij aan een verlaagde permeabiliteit voor gassen. Ofschoon in de literatuur vrij veel aanwijzingen hiervoor zijn te vinden, is het bewijs voor deze stelling nog niet geleverd.

Over de vraag, óf en in hoeverre het embryo een rol speelt bij de kiemrust, zijn de meningen verdeeld. Experimentele gegevens hierover zijn in de literatuur zeer schaars.

Door ons is op verschillende wijzen getracht te bewijzen, dat de kiemrust van tarwe afhankelijk is van eigenschappen van de korrelwand.

Door in de wandlagen boven het embryo een gaatje te prikken is het mogelijk, de kieming van in rust verkerende tarwekorrels aanzienlijk te verhogen. Eventuele wondstoffen kunnen worden verwijderd door de aangeprikte korrels gedurende een bepaalde tijd in stromend leidingwater te spoelen. Deze proeven zijn op blz.56-58 van het Verslag over 1957 van het Tien-jarenplan voor Graanonderzoek besproken. De kieming bevorderende werking van het beschadigen der wandlagen bleek voor een deel te berusten op de werkzaamheid van wondstoffen, maar voor het grootste deel op een betere gasuitwisseling tussen embryo en omgevende lucht.

Een andere benadering van het vraagstuk bestaat uit het uitvoeren van kruisingen tussen rassen met vrijwel geen en met een uitgesproken kiemrust* en het bepalen van de kiemrustcurven van korrels uit de F_1 - c.q. F_2 -generatie. Bij granen zijn de vruchtwand + zaadhuid opgebouwd uit weefsel afkomstig van de moederplant; terwijl het embryo ontstaan is uit de bevruchte eicel,

* Rassen waarbij de kiemrustperiode zeer kort duurt of ontbreekt, zijn schotgevoelig; rassen met een lange kiemrustperiode zijn resistent tegen schot.

d.w.z. de helft van zijn erfelijke eigenschappen van de moederplant en de andere helft van de vaderplant heeft gekregen. Bij reciproke kruisingen hebben wij dus te maken met korrels waarbij genetisch dezelfde (heterozygote) embryo's in het ene geval zijn omgeven door de wandlagen van de schotresistente ouder en in het andere geval door die van de schotgevoelige ouder.

Reeds in 1958 zijn door ons een drietal van dergelijke kruisingen verricht en onderzocht. De wijze van uitvoeren der kiemprouven en van bepalen der kiemrustcurven is op blz.58 van het Verslag over 1959 van het Tienjarenplan voor Graanonderzoek besproken. Bij de reciproke kruisingen van het schotresistente tarweras Leda met het schotgevoelige ras Minister bleken de beide kiemrustcurven der F_1 -korrels vrijwel samen te vallen en te verlopen tussen die der beide ouders in; dit resultaat zou erop wijzen, dat de wandlagen geen rol spelen bij het kiemrustmechanisme. Bij Mado (schotresistent) $\times$ Staring (schotgevoelig) viel de kiemrustcurve der F_1 -korrels, waarbij Mado de moederplant was, praktisch samen met de curve van de *schotresistente* ouder; de curve der reciproke kruising verliep tussen die der beide ouders in. Bij de kruising Dippe's Triumph (schotresistent) $\times$ Carsten's VI (schotgevoelig) tenslotte viel de kiemrustcurve der F_1 -korrels met Carsten's VI als moederplant samen met de curve van de *schotgevoelige* ouder; de curve van de reciproke kruising was ook nu weer gelegen tussen die der beide ouderrassen.

De drie onderzochte kruisingen vertoonden dus ieder een ander beeld. Bij nadere bestudering behoeven deze tegenstrijdige uitkomsten ons niet te verbazen: de F_1 -korrels van reciproke kruisingen verschillen – behalve in vruchtwand + zaadhuid – ook nog door het feit, dat zij op planten van verschillende rassen hebben gegroeid.

Bij de proeven uitgevoerd in 1960 en 1961, is getracht aan dit bezwaar tegemoet te komen door van enkelvoudige kruisingen uit te gaan en de kiemrustcurven van F_2 -korrels te bepalen. Deze korrels zijn F_2 wat de eigenschappen van het embryo betreft, d.w.z. zij vertonen tengevolge van het uitmenden een grote variabiliteit in eigenschappen. Zij zijn echter F_1 wat de eigenschappen van de wand betreft, d.w.z. alle korrels hebben dezelfde (heterozygote) wand. Alleen in het geval, dat de oorzaken van de rust in de wandlagen gelokaliseerd zijn en tevens dominant of recessief vererven, leveren kiemrustcurven van F_2 -korrels bruikbare resultaten op.

De volgende kruisingen werden in 1960 uitgevoerd: Leda $\times$ Minister, Mado $\times$ Minister, Mado $\times$ Carsten's VI, Jufy I $\times$ Carpo, Jufy I $\times$ Koga II, Peko $\times$ Carpo en Peko $\times$ Koga II. Hiervan zijn de rassen Leda, Mado, Jufy I en Peko schotresistent; de andere rassen zijn schotgevoelig. Van F_2 -korrels van deze kruisingen werden in 1961 kiemrustcurven bepaald; deze bleken steeds te liggen tussen die der beide ouders in. Dit kan het gevolg zijn zowel

van het genetisch heterozygoot-zijn van de wandlagen, als ook van het uitmenden van de embryoëigenschappen, of van een combinatie van beide mogelijkheden.

O.i. zal het via het onderzoek van kruisingsprodukten zeer moeilijk zijn een antwoord te geven op de vraag, in welke delen van de korrels het kiemrust-mechanisme gelokaliseerd is.

Voorts is getracht, om met behulp van radioactief gemerkt koolzuur ($C^{14}O_2$) de permeabiliteit van de wandlagen voor gassen direct te meten. Deze proeven werden in samenwerking met dr. J. BRUINSMAN van het Centrum voor Plantenfysiologisch Onderzoek te Wageningen uitgevoerd.

Hierbij werd als volgt tewerk gegaan: 20 korrels per monster werden gedurende 1 nacht in petrischalen met vochtig filtreerpapier op de bodem (4 ml water per schaal) geweekt, daarna afgedroogd en gedurende 30 minuten in een atmosfeer met radioactief koolzuurgas gebracht. Daarna werd het opgenomen $C^{14}O_2$ door aanbrengen van vacuum uit de korrels geëxtraheerd en in de vorm van bariumcarbonaat neergeslagen. Na droging werd het neerslag gewogen en de radioactiviteit bepaald.

De bepalingen werden met het ras Peko enige malen uitgevoerd zowel in de kiemrustperiode als in de nagerijpte toestand. De uitkomsten waren zeer grillig en lieten geen conclusies toe. Nagegaan dient te worden, of door wijzigingen in de gebruikte proefopstelling hierin verbetering gebracht kan worden.

B. VERBAND TUSSEN DE KIEMRUST VAN TARWE EN GERST EN HET GEHALTE AAN GEBONDEN DISULFIDEN

In het verslag over 1960 van het Tienjarenplan voor Graanonderzoek is op blz. 48-51 beschreven, dat er een nauwe relatie bestaat tussen het gehalte aan gebonden disulfidegroepen in de korrelwand en de kiemrust van tarwe. Deze vondst is o.i. een belangrijk aanknopingspunt voor verder onderzoek. In het afgelopen verslagjaar werden bovengenoemde proeven daarom herhaald en verder uitgebreid. Onderzocht werden de tarwerassen Peko en Carpo en de gerstrassen Balder en Herta. De histochemische disulfidekleuring volgens BARNETT en SELIGMAN werd uitgevoerd zowel in 5 μ dikke dwarscoupes door het midden der korrels als ook in 5 μ dikke lengtecoupes door het embryo. De coupes werden van ongefixeerd materiaal vervaardigd met behulp van een Leitz-sledebevriesmicrotoom. Per monster werden 25-30 korrels onderzocht.

Bij de vier onderzochte rassen bleek, dat de kiemrust samengaat met een intensieve disulfidekleuring in de zaadhuid en in de celwanden van de vrucht-

wand. Op de overgang van kiemrust naar nagerijpte toestand neemt de kleuring af: naast sterk gekleurde coupes zijn ook zwak gekleurde aanwezig, als ook overgangsvormen tussen beide typen. In nagerijpte toestand tenslotte is de disulfidekleuring zeer zwak.

Soortgelijke wijzigingen als in de wandlagen der korrels traden ook in de coupes van het embryo op, zij het dat de kleurreactie kwantitatief minder sterk was. Opvallend was, dat bij tarwe de disulfiden vooral in de celwanden gelokaliseerd zijn en dat bij gerst deze stoffen zich vooral in het cytoplasma bevinden. In beide gevallen ging de narijping gepaard met een duidelijke afname in kleurintensiteit.

Bij in kiemrust verkerende graankorrels is het mogelijk de kieming door bepaalde ingrepen kunstmatig te verhogen, o.a. door behandeling met gibberellinezuur en door droging.

Bij proeven met gibberellinezuur werden door ons tarwe- en gerstmonsters gedurende 16 uur geweekt resp. in water en in een oplossing van 100 p.p.m. gibberellinezuur, daarna kort gespoeld en op de gebruikelijke wijze te kiemen gezet. Bovendien werden na het weken van ieder monster 25 korrels histochemisch op de aanwezigheid van gebonden disulfidegroepen onderzocht. Deze proeven werden met korrels van de gerstrassen Balder en Herta en van het tarweras Peko enige malen verricht tijdens de kiemrust en in de overgangsfase naar de nagerijpte toestand.

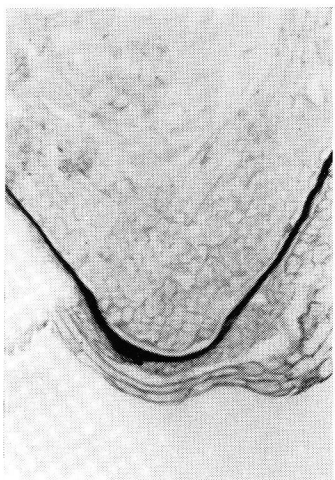
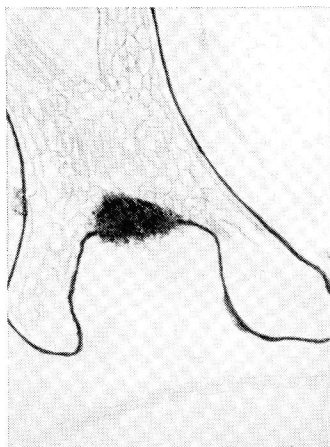
Als voorbeeld zijn in afb. 9 de uitslagen van kiemproeven weergegeven met korrels van het ras Peko. De proeven werden 18 dagen na de oogst ingezet, toen vrijwel alle korrels nog in kiemrust verkeerden. In afb. 8 zijn microfoto's van lengte- en dwarsdoorsneden weergegeven van de korrels resp. na het weken in water en in gibberellinezuuroplossing. Uit afb. 8 en 9 blijkt, dat door de gibberellinezuurbehandeling disulfidebruggen in celwanden zowel van vruchtwand + zaadhuid als ook van het embryo worden verbroken, en wel parallel gaande met een aanzienlijke toeneming van de kiemingsmogelijkheden. Soortgelijke resultaten werden eveneens verkregen met de beide onderzochte gerstrassen, met dien verstande dat hierbij in het embryo de disulfiden vooral in het cytoplasma en vrijwel niet in de celwanden gelokaliseerd zijn.

Bovenstaande resultaten zijn o.i. van verder strekkende betekenis dan alleen maar voor studie van het kiemrustmechanisme. Gibberellinezuur is nl. een in de moderne botanie veel bestudeerde groeistof; het is echter nog steeds niet bekend op welke wijze dergelijke stoffen hun werking uitoefenen. Onze proeven laten een synergisme zien tussen een gibberellinezuureffect en veranderingen in disulfideconcentratie in celwanden. Voor onderzoekers op groeistofgebied is dit ongetwijfeld een interessante waarneming.

PEKO, 1961 – 18 dagen na de oogstrijpheid

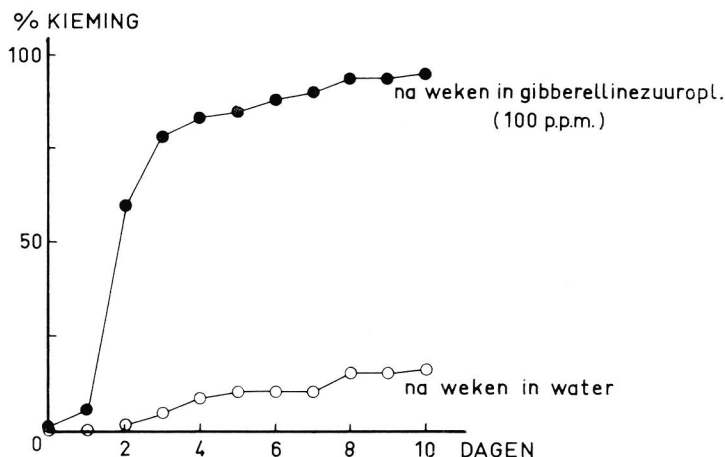
na weken in water

na weken in gibberellinezuur



AFB. 8. Microfoto's van dwarscoupes door de groeve (boven) en van lengtecoupes door het embryo (beneden) van korrels van het tarweras Peko. *Links*: na 16 uur weken in water, *rechts*: na 16 uur weken in 100 p.p.m. gibberellinezuuroplossing.

PEKO, 1961
18 dagen na de oogstrijpheid



AFB. 9. Verloop van de kieming van in rust verkerende korrels van het tarweras Peko, na 16 uur weken resp. in water en in 100 p.p.m. gibberellinezuuroplossing.

Door drogen der korrels (5 dagen bij een temperatuur van 35°C en een relatieve luchtvochtigheid van 30%) werd eveneens een aanzienlijke verhoging van de kieming verkregen, gepaard gaande met een duidelijke afname in het gehalte aan gebonden disulfidegroepen (proeven met Peko tarwe).

C. BEPALING VAN HET WATEROPNEMEND VERMOGEN VAN DE EMBRYO'S

Door enige onderzoekers is geconstateerd, dat tijdens de kiemrust de embryo's van tarwe (1) en van gerst (2) minder water opnemen dan in nagerijpte toestand. Wanneer de vochtopname van hele korrels werd bepaald, werden deze verschillen niet geconstateerd.

Tijdens de narijping treden in het embryoweefsel van tarwe en van gerst bepaalde wijzigingen op in het gehalte aan disulfidegroepen (zie onder B). De mogelijkheid bestaat, dat hierdoor eveneens veranderingen plaatsvinden in de permeabiliteit van de celwanden voor water en/of in het waterabsorberend vermogen van het cytoplasma. Daarom werd bij de tarwerassen Peko en Carpo en bij de gerstrassen Balder en Herta het watergehalte in hele korrels en in uitgeprepareerde embryo's bepaald na resp. 0, 1 en 2 dagen

laten weken van intacte korrels in petrischalen met vochtig filtreerpapier op de bodem (4 ml water per schaal). Alleen niet-gekiemde korrels werden onderzocht. De proef werd enige malen uitgevoerd tijdens de kiemrustfase, tijdens de overgang naar de nagerijpte toestand en bij volledig nagerijpte korrels.

Als voorbeeld zijn in de tabellen 1 en 2 de uitkomsten van de proeven met

TABEL 1. *Vochtgehalten (in %) van korrels en van embryonen van het tarweras Peko. Voorafgaande aan de bepaling was de tarwe gedurende 0, 1 en 2 dagen in water geweekt.*

Duur van het weken	11 dagen voor oogstrijpheid (kiemenergie*: 1%)	3 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 4%)	18 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 4%)	41 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 57%)	81 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 99%)
<i>Korrels</i>					
0 dagen	39,6	18,3	11,7	11,1	8,9
1 dag	41,5	33,5	30,6	30,0	29,7
2 dagen	43,6	37,5	36,1	35,7	34,2
<i>Embryonen</i>					
0 dagen	54,7	20,9	13,9	13,9	11,6
1 dag	57,7	54,4	54,7	54,1	52,1
2 dagen	60,8	61,2	57,4	60,3	58,0

* Onder kiemenergie verstaan wij het percentage korrels, dat bij 18°C en onder optimale wateromstandigheden in 3 dagen tijds kiemt.

TABEL 2. *Vochtgehalten (in %) van korrels en van embryonen van het gerstras Balder. Voorafgaande aan de bepaling was de gerst gedurende 0, 1 en 2 dagen in water geweekt.*

Duur van het weken	3 dagen voor oogstrijpheid (kiemenergie*: 0%)	6 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 2%)	28 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 50%)	56 dagen na oogstrijpheid (kiemenergie: 93%)
<i>Korrels</i>				
0 dagen	36,8	17,3	10,9	11,1
1 dag	40,4	34,2	33,2	34,9
2 dagen	41,6	36,3	35,1	36,4
<i>Embryonen</i>				
0 dagen	46,6	17,6	12,7	15,6
1 dag	53,4	52,8	56,7	58,2
2 dagen	55,6	54,8	57,8	63,1

* Onder kiemenergie verstaan wij het percentage korrels, dat bij 18°C en onder optimale wateromstandigheden in 3 dagen tijds kiemt.

Peko en Balder weergegeven. De andere onderzochte rassen vertoonden soortgelijke resultaten.

Uit deze tabellen blijkt, dat voor de oogst het vochtgehalte van korrels en embryo's vrij hoog is; bij het afrijpen daalt dit gehalte zeer snel, om na de oogst praktisch constant te blijven. Wanneer de korrels te weken worden gezet, nemen zij water op. Opvallend is, dat bij de verschillende proeven, de gedurende 1 resp. 2 dagen geweeke korrels steeds vrijwel dezelfde vochtgehalten vertoonden. Blijkbaar wordt de kiemrust niet veroorzaakt door een toeneming in het waterabsorberend vermogen van korrels of van embryo-weefsel.

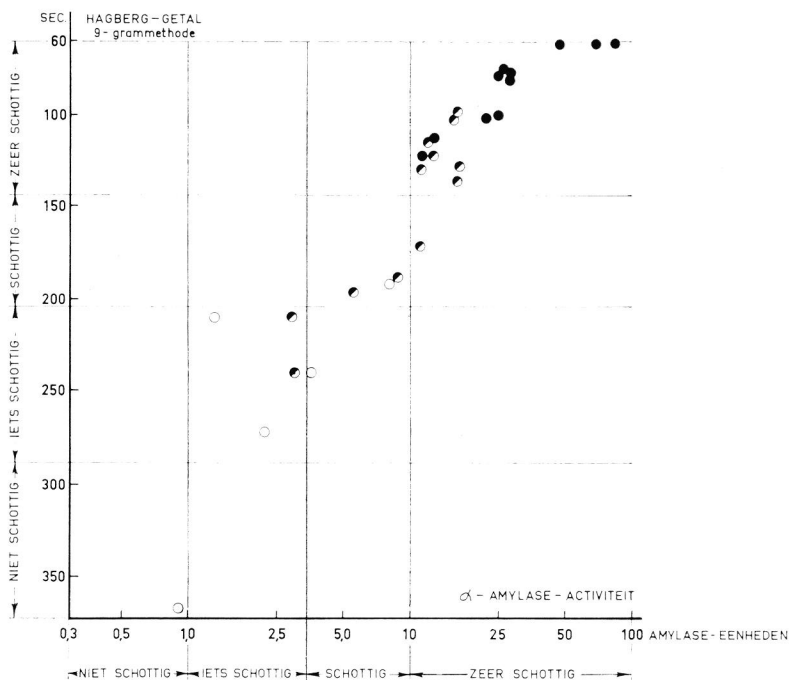
D. BEPALING VAN DE MATE VAN SCHOTAANTASTING

De meelfabrieken streven er naar alleen granen met geen of slechts een geringe mate van schotaantasting aan te kopen ter verwerking tot broodbloem. Brood, gebakken van meel van schottige tarwe of rogge, vertoont nl. vaak een kleffe kruim. Bovendien is het in jaren met schotaantasting voor de meelfabrikanten zeer moeilijk om een bloem van constante kwaliteit af te leveren. Het is bij het verhandelen van consumptietarwe daarom van veel belang te beschikken over een eenvoudige en tevens betrouwbare methode om de mate van schotaantasting te bepalen. Als regel moet de beslissing over het al dan niet accepteren van een aangeboden partij snel worden genomen. De toe te passen onderzoekmethode moet daarom in korte tijd kunnen worden uitgevoerd. Het uittellen van het percentage geschoten korrels is subjectief en geeft onvoldoende aanwijzingen over het *diastatisch vermogen* van de aangeboden partij, ook al door het feit dat hierbij geen rekening wordt gehouden met de eventuele aanwezigheid van verborgen schot.

Door ons is in 1957 de aandacht gevestigd op de dextrinemethode van LEMMERZAHL, welke zeer betrouwbare resultaten oplevert en eenvoudig uit te voeren is. Het nadeel van deze methode is de vrij lange tijdsduur, nl. 8 uur. Door uit te gaan van de halve hoeveelheid substraat en de reactie bij 40°C te laten verlopen, is het mogelijk de test in 2 uur uit te voeren. Ook deze tijdsduur is voor praktische toepassing dikwijls nog te lang.

Door HAGBERG is in 1958 een nieuwe methode ter bepaling van de *diastatische kracht* van granen en maalprodukten gepubliceerd; de methode is uitvoerig beschreven in het tijdschrift Cereal Chemistry (3, 4). Hiermede is het mogelijk om zeer snel (binnen 15 minuten) een indicatie te verkrijgen over de mate van schotaantasting. Bij deze methode wordt als volgt tewerk gegaan:

9 gram gemalen korrels of meel worden met 25 ml water in een reageerbuis



AFB. 10. Verband tussen het Hagberggetal en de alfa-amylaseactiviteit (bepaald aan gemalen korrels) van monsters inlandse tarwe. Van bloem van deze tarwe is brood gebakken.

- : normale broodkruim
- ◐: iets kleffe broodkruim
- : kleffe en zeer kleffe broodkruim

van bepaalde afmetingen gesuspenseerd. De buis wordt daarna in een kokend waterbad gedompeld, een stophorloge wordt ingedrukt en de inhoud van de buis met een roerder van bepaald type op voorgeschreven wijze gemengd. Eén minuut na het indompelen wordt de roerder in zijn hoogste positie geplaatst en losgelaten. Nadat de roerder over een bepaalde afstand in de verstijfselde suspensie is doorgedrongen, wordt het stophorloge wederom ingedrukt. De tijd, welke op het horloge wordt afgelezen, is het z.g. *Hagberggetal*.

Bij het verwarmen van de suspensie in het waterbad treedt bij temperaturen boven ca. 65°C verstijfseling van het zetmeel op. De in gemalen korrels of bloem aanwezige alfa-amylase heeft daarna gelegenheid dit zetmeel aan te tasten. Hoe hoger de alfa-amylaseactiviteit is (= hoe groter de mate van schotaantasting is), des te lager zal het Hagberggetal zijn.

Door ons is de Hagberg-methode uitvoerig op haar bruikbaarheid onderzocht. In de originele methode wordt uitgegaan van 7 gram gemalen korrels of meel. Hiermede bleek het scheidend vermogen bij schottige en zeer schottige monsters te gering te zijn. Door echter uit te gaan van 9 gram materiaal werd dit bezwaar ondervangen.

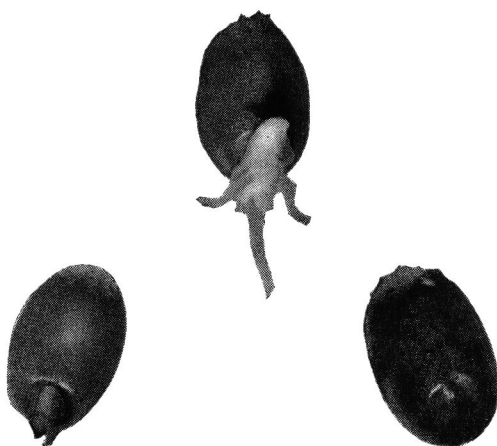
De bruikbaarheid van de 9-grammethode is inmiddels getoetst aan de hand van 183 monsters gemalen korrels van inlandse tarwe en van 40 monsters A- en W-bloem, gemalen van mengmonsters inlandse tarwe en importtarwe. Er bleken zeer goede correlaties te bestaan tussen het Hagberggetal, het dextrinegetal van LEMMERZAHN en de alfa-amylaseactiviteit volgens JONGH. Ter illustratie is in afb. 10 het verband weergegeven tussen het Hagberggetal, de alfa-amylaseactiviteit (beide bepaald in gemalen korrels) en de klefheidsbeoordeling van de broodkruim (wittebrood). De onderzochte monsters zijn afkomstig van het onderzoek „Registratie van het Bakwaardeniveau van de Inlandse Tarweoogst 1960”, dat door ir. E. K. MEPPINK op blz. 27–36 van het Verslag over 1960 van het Tienjarenplan voor Graanonderzoek is beschreven. De in afb. 10 weergegeven alfa-amylaseactiviteiten zijn niet omgerekend op droge stof.

Met de door HAGBERG ontworpen methode is het derhalve mogelijk zeer snel en op eenvoudige en betrouwbare wijze de mate van schotaantasting in monsters tarwe te bepalen.

E. LITERATUUR

1. WELLINGTON, P. S. and V. M. DURHAM. Studies on the germination of cereals. 3. The effect of the covering layers on the uptake of water by the embryo of the wheat grain. *Ann. of Bot., N.S.*, **25** (1961), 185–196.

2. FISCHNICH, O., M. THIELEBEIN und A. GRAHL. Sekundäre Keimruhe bei Getreide. Proceedings International Seed Testing Association, **26** (1961), 89-114.
3. HAGBERG, S. A rapid method for determining alpha-amylase activity. Cereal Chemistry, **37** (1960), 218-222.
4. HAGBERG, S. Note on a simplified rapid method for determining alpha-amylase activity. Cereal Chemistry, **38** (1961), 202-203.



AFB. 11. Verschillende stadia van schot bij tarwe

