

Heuningbos (*Cyclopia* spp.) volwasse embrioweefselkultuur en die effek van peulposisie op saadkleur

Outeurs:

Jenifer Koen^{a,b}
Martha M Slabbert^b
Mardé Booysse^c
Cecilia Bester^a

Affiliaties:

^aLandbounavorsingsraad
Infruitec-Nietvoorbij,
Privaatsak X5026,
Stellenbosch 7599,
Suid-Afrika

^bDepartement van Tuinbou,
Tshwane Universiteit van
Tegnologie, Privaatsak X680,
Pretoria 0001, Suid-Afrika

^cLandbounavorsingsraad
Biometrie, Privaatsak
X5026, Stellenbosch 7599,
Suid-Afrika

Korresponderende outeur:

Jenifer Koen
E-pos:
drjen.greenscience@gmail.com

Datums:

Ontvang: 05/07/20
Aanvaar: 31/05/21
Gepubliseer: 19/08/21

Hoe om hierdie artikel aan te haal:

Jenifer Koen, Martha M Slabbert, Mardé Booysse, Cecilia Bester, Heuningbos (*Cyclopia* spp.) volwasse embrioweefselkultuur en die effek van peulposisie op saadkleur, *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie* 40(1) (2021).
<https://doi.org/10.36303/SATNT.2021.40.1.798>

An English copy of this paper is available online at <http://www.satnt.ac.za/index.php/satnt/article/view/798>

Kopiereg:

© 2021. Authors.
Licensee: *Die Suid-Afrikaanse Akademie vir Wetenskap en Kuns*. Hierdie werk is onder die Creative Commons Attribution License gelisensieer.

Plante (verskillende genotipes) van *Cyclopia* spesies word gebruik om Suid-Afrikaanse heuningbostee ('n kruietee produk) te produseer en word tans deur teling vir grootskaalse verbouing verbeter. Saaddimorfisme en dormansie beïnvloed egter die ontkiemingspersentasie negatief. Deur gebruik te maak van volwasse embrioweefselkulture is studies om die ontkiemingspersentasie van saad te verhoog op *C. longifolia*, *C. maculata* en *C. subternata* gedoen. Die effek van stratifikasie op saadontkieming deur geen of 'n kouebehandeling toe te pas, is ook ondersoek. Volwasse embryos is hierna uit sade verwyder en vir 'n 24-uur fotoperiode by 25°C ± 1°C op weefselkultuur gekweek. Die kweek van volwasse embryos deur middel van weefselkulture was suksesvol en het deurlopend meer plante vergeleke met konvensionele saaimetodes gelewer. Studies om die effek wat saadpeulposisie van die moederplant op saadkleur het, is ook gedoen. Volwasse heuningbospeule is vanaf die boonste, middelste en onderste-derdes van die blaarbedekte deel van die heuningbosplante versamel om die aantal groen/intermediêre/bruin sade wat by elke gedeelte geproduseer is, te bepaal. Die verhouding van saaddimorfisme wat by elke gedeelte geproduseer word, kon egter nie deur peulposisie voorspel word nie.

Sleutelwoorde: embrioweefselkultuur, *in vitro*, kouebehandeling, saaddimorfisme, saaddormansie

Honeybush (*Cyclopia* spp.) mature embryo culture and the influence of pod position on seed colour: Plants (different genotypes) of *Cyclopia*, used for production of South African honeybush tea (a herbal tisane product), are being improved through breeding for large-scale cultivation, but seed dimorphism and dormancy negatively affect germination percentage. In order to increase the percentage of plants that can be obtained from a batch of seed, mature embryo culture and the influence of pod position on seed colour were investigated for *C. longifolia*, *C. maculata* and *C. subternata*. Mature embryos were excised and cultured *in vitro* at 25 °C ± 1 °C, 24-hour photoperiod, with and without prior cold treatment. The culture of mature embryos proved to be very successful, consistently resulting in more plantlets than conventional sowing. Mature honeybush pods were also collected from the upper, middle and lower-third foliar portions of honeybush shrubs to determine the number of green/indeterminate/brown seeds produced in each position. However, the ratio of dimorphic seed colours produced could not be predicted by pod position.

Keywords: embryo culture, *in vitro*, dormancy, cold treatment, seed dimorphism

Inleiding

Die genus *Cyclopia* (Familie Fabaceae) is inheems tot die fynbosareas van Suid-Afrika. Daar is 23 erkende spesies binne die genus, almal kruidagtige struik van verskeie groottes. Slegs 'n handvol van hierdie spesies word kommersieel vir "heuningbostee" produksie verbou (Schutte, 1997). Die klein, dog groeiende, heuningbosindustrie voer nagenoeg 390 ton jaarliks uit, met 'n uitvoerwaarde van R 23 miljoen (Departement van Landbou, Bosbou en Visserye, 2016; McGregor, 2017). Kweesies rakende die verbouing en teling van heuningbos het 'n aantal studies geïnisiëer wat ter ondersteuning van die industrie aangepak is. Die doel van die hierdie studie was om die aantal plante wat vanaf 'n saadgroep verkry kan word, te verhoog. Probleme rondom saaddormansie, kiemkragtigheid van volwasse saad, asook saadkleur in verhouding tot peulposisie op die plant, is ondersoek. Volwasse embryo-redding vir klein saadgroepe as 'n alternatief vir konvensionele saaimetodes is ook ondersoek.

Direk na afloop van bevrugting, groei en verleng die vrugbeginsels van peulgewasse en word peule gevorm. In die peul ontwikkel die bevrugte kiemselle in klein saadjies (3 tot 5 mm).

Hierdie saadjies het drie geneties-duidelike komponente: die embrio, die endosperm en die saadhuid (Koen et al., 2017). Heuningbosspesies produseer volwasse saad met 'n bruin en/of groen saadhuid, beide kleure word dikwels in dieselfde peul geïnisieer en gevorm (M. Motsa, pers. komm., 2015). 'n Vorige studie het, deur verskillende saadbehandelings toe te pas, bevind dat die verskille in *Cyclopia spp* se saadkleur ooreenstem met die verskille in die ontkiemingspersentasie (Koen et al., 2017). Resultate van bogenoemde studie het ook getoon dat bruin sade fisies minder noodlottige beskadiging opdoen weens die skarifikasieproses vergeleke met groen sade. Die faktore wat die produksie van verskillende saadkleure van die saadhuid affekteer is tot dusver nog nie vir heuningbos geïdentifiseer nie, maar dit is al bewys dat moederplant omgewingsfaktore dimorfiese saadproduksie van ander spesies affekteer (Cheplick en Sung, 1998; Wang et al., 2008).

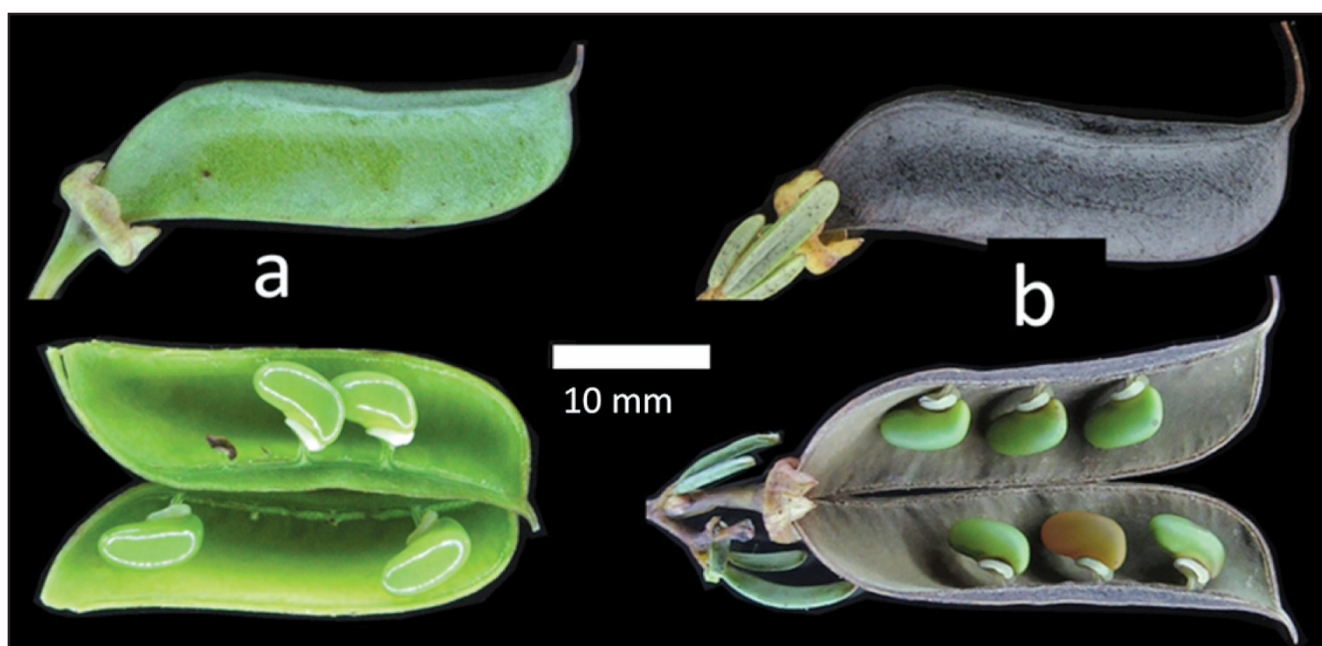
Indien bepaal kan word dat die posisie van die peul op die plant 'n spesifieke saadkleur tot gevolg kan hê, kan eenderskleurige sade saam geoes word. Sodoende kan die oesproses aangepas word om meer uniforme saadgroepe te verkry. Uitsortering van saad na afloop van die oes kan dan onnodig word. Heuningbossaad het, afhangend van die betrokke spesie, een van beide fisiese of 'n gekombineerde saaddormansie (Baskin en Baskin, 2004; Koen et al., 2017). Hierdie dormansie moet oorkom word alvorens ontkieming kan plaasvind. *In vitro* uitsnyding en kweek van volwasse heuningbosembrios voordat saadrypwording en uitdroging plaasvind kan fisiese dormansie omseil. Fisiologiese dormansie mag sodoende ook met hulp van hierdie metode omseil word (Debeaujon et al., 2018). Die voorkoms van hierdie dormansies en die gepaardgaande verliese wat voorkom weens konvensionele dormansie-brekende behan-

delings, dra by tot die lae persentasie ontkieming van heuningbossaad (Koen, et al., 2017).

Fisiologiese dormansie kan endogeen of eksogeen relatief tot die embrio wees. Endogene dormansie word veroorsaak deur faktore binne die embrio en eksogene dormansie deur faktore soos inheerende stowwe binne die saadhuid (Baskin en Baskin, 2004). Indien fisiologiese dormansie in heuningbos eksogeen is, sal die verwydering van embrios vanuit hul omliggende weefsel hierdie faktore en die behoefte vir dormansie behandeling soos kouestratifikasie, kan omseil.

Aan die ander kant, indien embrios van gehidreerde sade (Fig. 1.a) nie fisiologiese dormansie toon nie, terwyl teenoor embrios wat vanuit gedehidreerde sade verwyder word (Fig. 1.b) wat wel hierdie dormansie toon, mag dit 'n aanduiding wees dat endogene fisiologiese dormansie binne in die embrio tydens of na die uitdroging tydens saad volwassewording ontwikkel.

In heuningbosspesies word fisiologiese dormansie algemeen met 'n sogenaamde "herspruiter" teenoor 'n "hersaaier" veldbrand-oorlewingsstrategie geassosieer (Whitehead en Sutcliffe, 1995; Joubert et al., 2011; Wooldridge et al., 2012; Koen, 2015; Brink et al., 2017). Schutte (1997) beskryf veldbrand-oorlewingsstrategie, of die voorkeur om baie saad te vorm (sogenaamde "hersaaier" spesies) teenoor die produksie van 'n houtagtige ondergrondse wortelstok ("herspruiter" spesies), as 'n handige werktuig om tussen die eienskappe van die heuningbosspesies te onderskei. Hierdie strategie is egter bekend om ook polimorfies in sekere heuningbosspesies te wees (Schutte, 1997; Joubert en Joubert, 2012). *Cyclopia longifolia*, *C. subternata* en *C. maculata* is as hersaaier spesies geklassifiseer (Schutte,



FIGUUR 1: *Cyclopia subternata* peule, a = voor natuurlike uitdroging (gehidreerde saad); b = na natuurlike uitdroging (gedehidreerde saad)

1997; Joubert et al., 2011). Joubert en Joubert (2012) het egter aangedui dat *C. longifolia* as 'n hersaaier of herspruiter kan reageer. Daarom het Schutte (1997) doelbewus nie hierdie eienskap van spruitende versus nie-spruitende as klassifikasie in haar kladistiese analise ingesluit nie, omdat dit as 'n "polimorfiese karakter" beskou word wat in sekere populasies teenwoordig en in ander afwesig is.

Alle heuningbosspesies wat voorheen getoets is, het voordeel (in terme van ontkiemingstempo en persentasie) getoon deur 'n voorafgaande koueperiode opgevolg deur waterabsorpsie voor inkubasie of saai (Koen et al., 2017; Whitehead en Sutcliffe, 1995). Fisiologiese dormansie is egter nog nie algemeen vir heuningbosspesies gerapporteer nie.

Materiaal en metodes

Al die plantmateriaal wat in die eksperimente gebruik was, is versamel van oopbestuiewende heuningbosplante in saadboorde van die Landbounavorsingsraad Nietvoorbij Navorsingsplaas (S 33° 54' 23.417" E 18° 52' 14.196"), naby Stellenbosch in die Weskaap Provinsie van Suid-Afrika. Plantmateriaal is gedurende die tydperk Julie tot Oktober 2017 van drie spesies, i.e., *C. longifolia*, *C. maculata* en *C. subternata*, versamel. Alle chemiekalieë en laboratorium verbruikbare items is van Sigma-Aldrich, Inc. verkry.

Volwasse embrioweefselkultuur

Versameling van plantmateriaal

Elke saadgroep was vanaf verskeie individuele kloonplante, afkomstig van dieselfde genotipe, versamel, behalwe vir gedehidreerde saad van *C. maculata*, wat 'n mengsel van verskeie genotipes was. Beide gehidreerde en gedehidreerde saad is van *C. longifolia*, kloon LHK8. Vir *C. maculata*, is gehidreerde saad van kloon MBV4 versamel en gedehidreerde saad van 'n non-spesifieke *C. maculata* mengsel van klone verkry. Vir *C. subternata*, is beide gehidreerde en gedehidreerde saad van kloon SKB6 versamel. Ten einde embrios van beide saadtipes te verkry, naamlik 1) volwasse gehidreerde, en 2) volwasse gedehidreerde saad, is saadpeule net voor en direk nadat die natuurlike proses van saadvolwasewording plaasgevind het, geoes (Fig. 1.a-b). Dit is aanvaar dat gedehidreerde saad binne 'n saadgroep dieselfde vlak van volwassenheid bereik het. Aangesien saad vanaf oopbestuifde bronne van plante verkry is en die aantal dae wat verloop het na bestuiwing onbekend was, kon die volwassenheidsvlak van die gehidreerde saad nie presies vasgestel word nie, en kan dus verskil. Ten einde uniforme resultate tussen die gehidreerde saad te verseker, is saadgroepe gekies vir ooreenstemming met elke spesie. Indien dit bevind is dat die spesifieke embrio volkome volwasse is (op die laaste stadium van ontwikkeling voor uitdroging), is hierdie saadgroep gebruik as 'n visuele gids en is gehidreerde saad met dieselfde morfologiese eienskap geselekteer vir daardie spesie vir

die res van die eksperiment. Tien embrios is vir elke herhaling gedissekteer, met vier herhalings per behandeling.

Saadbehandeling

Gedehidreerde saad het 'n skarifikasie en rehidrasie behandeling benodig voor die embrios gedissekteer kon word en is voor die oppervlaksterilisasie afgehandel. Skarifikasie is gedoen deur die saad in gekonsentreerde (95%) swaelsuur te plaas waarna dit drie keer met water afgespoel is. Suurblootstelling is vir een uur vir *C. longifolia*, 45 min vir *C. maculata* en een uur vir *C. subternata* (Bester en Koen, 2017) toegepas. Die gedehidreerde saad was toegelaat om vir 6 ure in water te week. Geen addisionele behandeling is toegepas nie. Dieselfde sterilisasiemetode is vir beide die gehidreerde en gedehidreerde sade se buitenste oppervlakte gevolg. Die saad is onder lopende kraanwater vir 15 minute afgespoel, waarna dit vir vyf minute in 'n 1% natriumhipochloriedoplossing geweek is. Daarna is die saad drie keer met steriele water afgespoel voordat dit vinning (vir ongeveer een minuut) in etanol gespoel is wat met drie finale afspoelings met gesteriliseerde water opgevolg is. Gehidreerde saad se buitenste oppervlak is egter gesteriliseer direk nadat dit vanuit die peule verwyder is. Embrios van elke saadtipe is onder steriele toestande gedissekteer deur gebruik te maak van 'n laminêre vloekabinet.

Weefselkultuurmedium

Embrios is op Murashige en Skoog (1962) basiese medium, Sigma-Aldrich, Inc. produk kode M5524, geplaas. Die basiese medium is voorberei teen halfsterkte en deurgaans in die studie gebruik, i.e., dat 4.3 gram poeier in twee liters water in plaas van een liter water opgelos is. Volgens literatuur word wortelgroei hierdeur gestimuleer (Dewir et al., 2016; Kokotkiewicz et al., 2012; Pratap et al., 2010; Sánchez-Romero et al., 2007; Smith, 2013). Die voorafbe-reide MS basiese mediummengsel wat beide sout en vitamienes ingesluit het, is saam met plantweefselkultuur-agar (0.8% w/v), sukrose (1.5% w/v) en geaktiveerde houtskoolpoeier (0.8% w/v) voorberei, waarna die mediums se pH aangepas is na 5.6 voor dit in 'n outoklaaf gesteriliseer is. Medium is in polistireen petribakkies (95 mm) gegiet, agt bakkies per medium, ongeveer 30 ml per bakkie. Nadat die embrios gedissekteer en op medium geplaas was, is die bakkies met Parafilm® geseël.

Inkubasie kondisies en dataversameling

Die helfte van die petribakkies is direk in 'n temperatuur beheerde inkubator teen 25°C ± 1°C met 'n 24-uur fotoperiode en 35 μmol m⁻² s⁻¹ ligintensiteit geplaas. Die oorblywende petribakkies is in 'n yskas teen 4°C in die donker vir twee weke geplaas (koue stratifikasie behandeling), voordat dit in die inkubator geplaas is. Elke petribakkie het 10 embrios bevat en een herhaling verteenwoordig. Vir elke embrio wat direk in die inkubator geplaas is, het dag 7 die eerste observasie dag verteenwoordig. Vir

embrios wat 'n kouehandeling ontvang het voordat dit in die inkubator geplaas is, was die eerste dag in die inkubator (dag 0) die eerste observasie dag omdat daar verwag was dat sommige van die embryos gedurende die twee weke kouehandeling reeds kon begin ontkiem het (Koen et al., 2017). Wanneer die gesamentlike wortel en hipokotielengte ≥ 10 mm bereik en al die saadlobbe oopgegaan het, was die embryos getel as ontkiem en uit die petribakkie verwyder en in 'n 180 ml kultuurbottel, wat op dieselfde metode met halfsterkte MS basiese medium formule vir voortgesette groei (ongeveer 30 ml per bottel) voorberei is, geplaas.

Positiewe kontrole

Tweehonderd sade elk van *C. longifolia* (LHK8), *C. maculata* (verskeie klone van 2017) en *C. subternata* (SKB6) is in aparte saailaai gesaai sodat die sukseskoers tussen embryo-kulture en konvensionele saaimetode vergelyk kon word. Groeimedium vir saailaai en suurskarifikasie is volgens die heuningboshandleiding vir saailinge van die Landbounavorsingsraad uitgevoer (Bester en Koen, 2017).

Statistiese Metodes

'n Volkome ewekansige blokontwerp is as eksperimentele uitleg gebruik. Ses eksperimente (drie spesies met twee saadtipes elk) is gekombineer nadat die variansie van homogenisiteit getoets is (Levene, 1960). Elke eksperiment het uit 'n split-plot bestaan waar medium die hoofplot en stratifikasiebehandeling die subplot was. Die data is as persentasie ontkieming waargeneem en aan gekombineerde analise van variansie onderwerp deur van die General Linear Models Procedure (PROC GLM) van SAS sagteware (Version 9.4; SAS Institute Inc, Cary, USA) gebruik te maak. Shapiro-Wilk toets is uitgevoer op die gestandariseerde residue van die model om normaliteit te verifieer (Shapiro en Wilk, 1965). Fisher's se nie-betekenisvolle verskil is teen die 5% waarskynlikheidsvlak bepaal deur behandelings se gemiddeldes te vergelyk (Ott en Longnecker, 2001). 'n Waarskynlikheidsvlak van minder of gelyk aan 5% is vir alle toetse as betekenisvol aanvaar.

Effek van peulposisie

Versameling van plantmateriaal

Volwasse, toe-peule van oopbestuifde saadboorde is versamel om die effek van peulposisie op saadkleur-dimorfisme te bepaal. Vyftien peule is vanaf die onderste, middel en boonste derde van twee spesies en drie heuningbosklone per spesie versamel. Die *C. longifolia* klone LGR2, LHK23 en LHK35 en die *C. maculata* klone MBV3, MBV4, MBV10 was gebruik. Vyf peule per herhaling met drie herhalings per kloon was gebruik. Die spesie *C. subternata* kon ongelukkig nie in die studie ingesluit word nie omdat die volwasse peule reeds deur werkers versamel en gemeng was. Nadat die peule uitgedop is, is die saad volgens peulposisie en herhaling gegroepeer terwyl die klone en spesies apart gehou is. Die saad is in drie kleur-groepe verdeel (groen, bruin en intermediêr) en getel.

Statistiese Metodes

Die eksperimentele uitleg was 'n volkome ewekansige blokontwerp wat bestaan het uit drie herhalings, twee spesies en drie klone per spesie. Die behandelingsuitleg binne 'n spesie was 'n split-split plot met klone as hooffaktor. Die eerste subplotfaktor was die saadposisie (onderste, middel en boonste derde van die plant) en die tweede was die saadkleur (groen, bruin en intermediêr). Die Levene toets het getoon dat daar geen heterogene (nie vergelykbaar) spesie variansies is nie (Levene, 1960). Om laasgenoemde rede is die data aan 'n geweeegde gekombineerde analise van variansie onderwerp deur die General Linear Models Procedure (PROC GLM) van SAS sagteware (Version 9.2; SAS Institute Inc, Cary, USA) te gebruik. Die gewigte was die wedersydse variansie van elke spesie (John en Quenouille, 1977). Die Shapiro-Wilk toets is uitgevoer op die gestandariseerde residue van die model om normaliteit te verifieer (Shapiro and Wilk, 1965). Fisher's se nie-betekenisvolle verskil is bepaal teen die 5% waarskynlikheidsvlak deur behandelingsgemiddeldes te vergelyk (Ott en Longnecker, 2001). 'n Waarskynlikheidsvlak van minder of gelyk aan 5% is as betekenisvol vir alle betekenisvolle toetse aanvaar.

Resultate

Volwasse embrioweefselkultuur

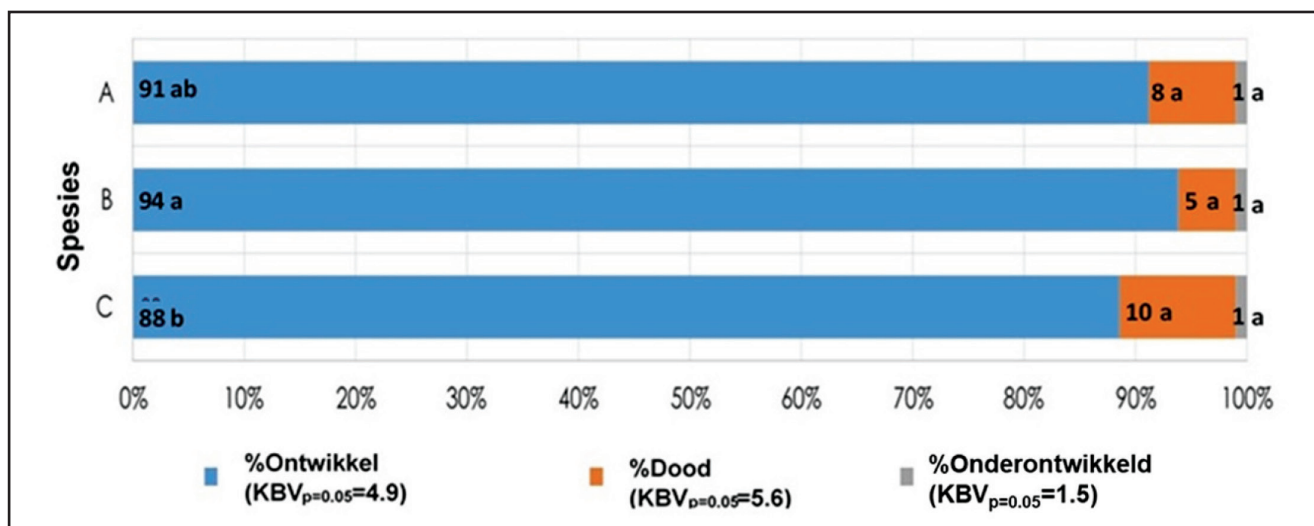
Resultate van die konvensionele gesaaide saad (positiewe kontrole) was 75% ontkieming vir *C. longifolia*, 38% vir *C. maculata* en 70% vir *C. subternata* (geen figuur beskikbaar).

Spesies

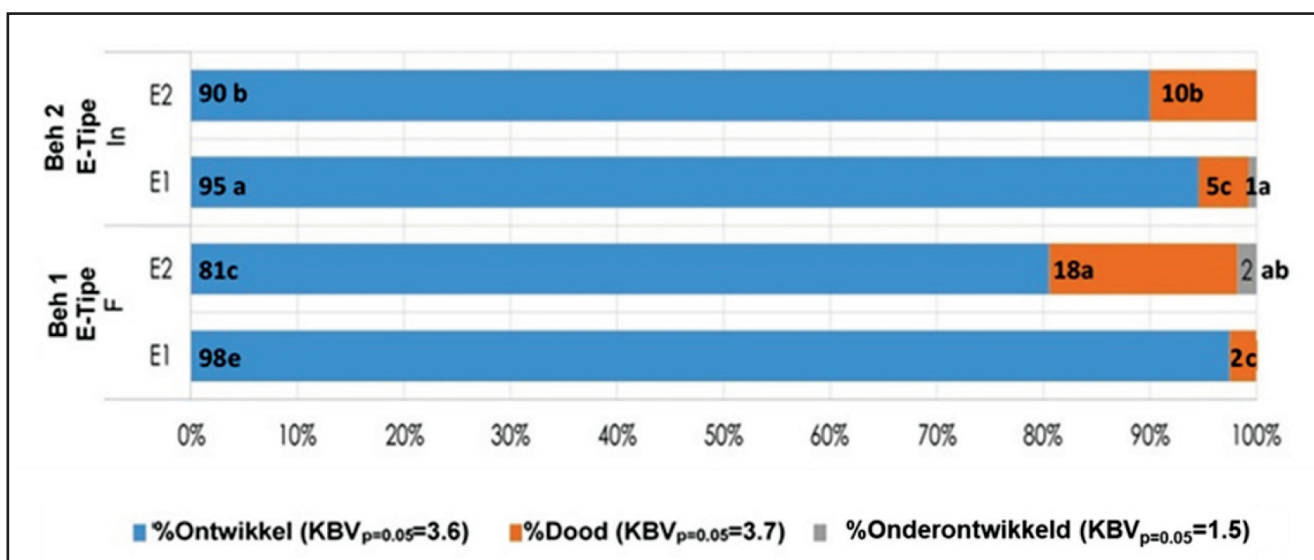
Klein, maar betekenisvolle verskille is gesien in die aantal embryos wat ontwikkel en die wat mikrobiële kontaminasie gekry het (dood) (Ontwikkel: kleinste betekenisvolle verskil (KBV)_{p=0.05}=4.9; Dood: KBV_{p=0.05}=5.6; Fig. 2). Geen betekenisvolle verskille is waargeneem in die aantal embryos tussen die drie spesies wat onderontwikkel gebly het nie. *Cyclopia maculata* en *C. longifolia* het die hoogste persentasie embryos wat ontkiem het gehad, maar dit was nie betekenisvol verskillend tussen die twee spesies nie. Alhoewel daar geen betekenisvolle verskille tussen *C. subternata* en *C. longifolia* was nie, het betekenisvol minder *C. subternata* embryos in vergelyking met *C. maculata* ontkiem. Die aantal plante wat vanaf embrioweefselkulture verkry is, was met 24% vir *C. longifolia*, 56% vir *C. maculata* en 18% vir *C. subternata* meer as die positiewe kontrole.

Kouehandeling

Daar was geen betekenisvolle verskille tussen hoe spesies met of sonder kouehandeling gereageer het nie en gevolglik is spesies saamgevoeg vir 'n totaal van 120 embryos per behandeling. Betekenisvolle verskille is in die aantal embryos wat ontwikkel het, dood is en die wat



FIGUUR 2: Persentasies van *Cyclopiia* spp. embryos wat ontwikkel het, dood is of onderontwikkel gebly het, volgens die spesie. A = *C. longifolia*; B = *C. maculata*; C = *C. subternata*. Gemiddeldes met dieselfde kleur en letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0.05$ nie. Waardes afgerond tot die naaste heelgetal.



FIGUUR 3: Persentasies van *Cyclopiia* spp. embryos wat ontwikkel het, dood is of onderontwikkel gebly het volgens die behandeling en embriotipe. Behandeling 1 = koue behandeling; Behandeling 2 = sonder kouebehandeling; E-tipe = embriotipe; E1 = gehidreerde embryos; E2 = gedehidreerde embryos. Gemiddeldes met dieselfde kleur en letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0.05$ nie. Waardes afgerond tot die naaste heelgetal. Nul waardes uitgelaat.

onderontwikkel gebly het asook in die interaksie tussen behandeling en embrio tipe gevind (Ontwikkel: $KBV_{p=0.05}=3.6$; Dood: $KBV_{p=0.05}=3.7$; Onderontwikkel gebly: $KBV_{p=0.05}=1.5$) (Fig. 3). In beide behandelings is betekenisvolle groter persentasies van ontwikkelde embryos in vergelyking met gedehidreerde embryos gevind. Daar was geen betekenisvolle verskille tussen die resultate vir gehidreerde embryos vir beide behandelings nie (Fig. 3) en vir gedehidreerde embryos, het die kouebehandeling betekenisvol minder plante in vergelyking met die behandeling sonder koue gehad.

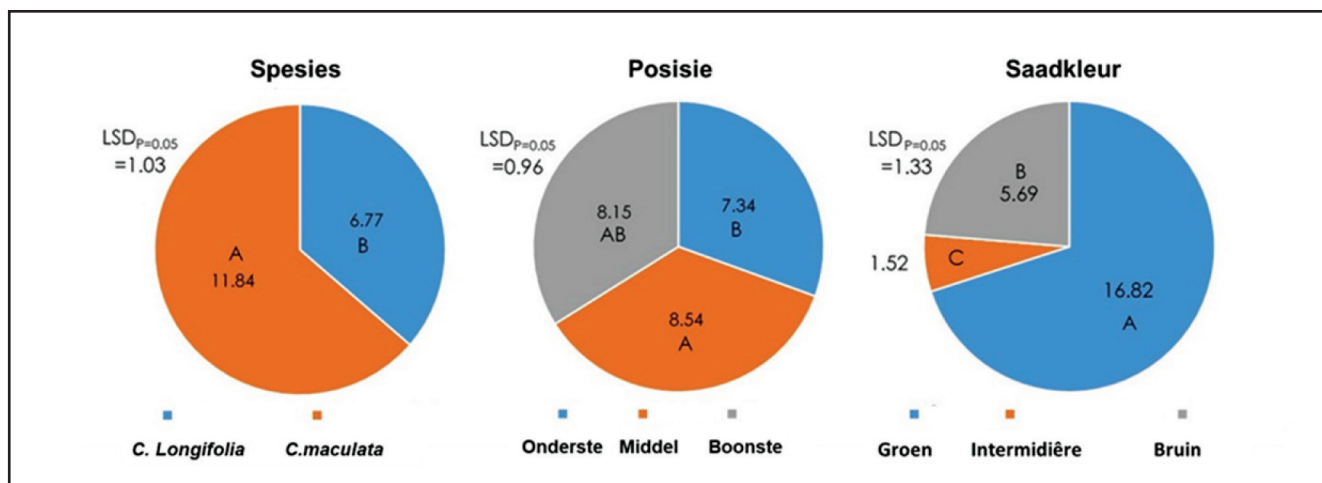
Soos verwag, het 'n aantal embryos (ongeveer 5%) gedurende die koue stratifikasie behandeling begin ontkiem. Dit is ook waargeneem dat selfs embryos wat nie gedurende die kouebehandeling ontkiem het nie, opmerklik in grootte toeneem het terwyl hulle proporsioneel hul embrioniese

verhouding behou het en vining ontwikkel het na verskuiwing na die groeikabinet.

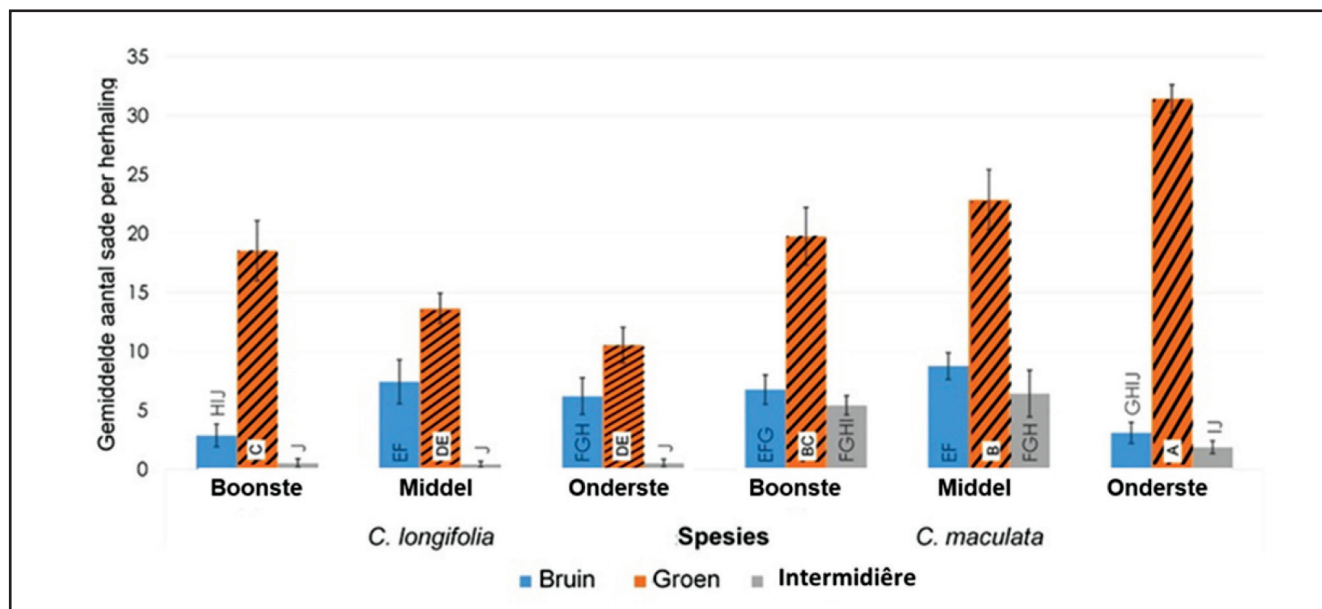
Effek van peulposisie

Gemiddelde aantal sade versamel vir spesie, peulposisie en saadkleur

Die gemiddelde aantal sade per peul wat per spesie versamel is, betreffende al die faktore, was 11.84 vir *C. maculata* en 6.77 vir *C. longifolia*. Die spesie *C. maculata* het betekenisvol meer saad per peul as *C. longifolia* gevorm ('n verskil van 27%; $KBV_{p=0.05}=1.03$; Fig. 4). Peulposisie het nie 'n groot effek op op die aantal sade wat gevorm het gehad nie. Die gemiddelde aantal sade per peul versamel, betreffende al die faktore, was 8.54 vir die boonste posisie, 8.15 vir die middel posisie en 7.34 vir die onderste posisie. Peule wat vanaf die boonste posisie geneem is, het meer



FIGUUR 4: Gemiddelde aantal *Cyclopiia* spp. sade wat vanarsamel is, verwerk vir spesies, posisie en saadkleur onderskeidelik. Gemiddeldes met dieselfde kleur en letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0$ nie.



FIGUUR 5: Gemiddelde aantal *Cyclopiia* spp. sade per spesie per herhaling (vyf peule) versamel, saamgevoegde spesie interaksies tussen spesies, peulposisie, en saadkleur. Gemiddeldes met dieselfde letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0.05$ nie.

sade as die van laer posisies geproduseer, maar die verskil, alhoewel statisties betekenisvol, was klein (3%; $KBV_{p=0.05}=0.96$; Fig. 4). Die gemiddelde aantal sade per saadkleur versamel, betreffende al die faktore, was 16.82 vir groen, 5.69 vir bruin en 1.52 vir intermediêre. Oor die algemeen was betekenisvol meer groen (70%) teenoor bruin (24%) of intermediêre saad (6%) gevorm ($KBV_{p=0.05}=1.33$; Fig. 4).

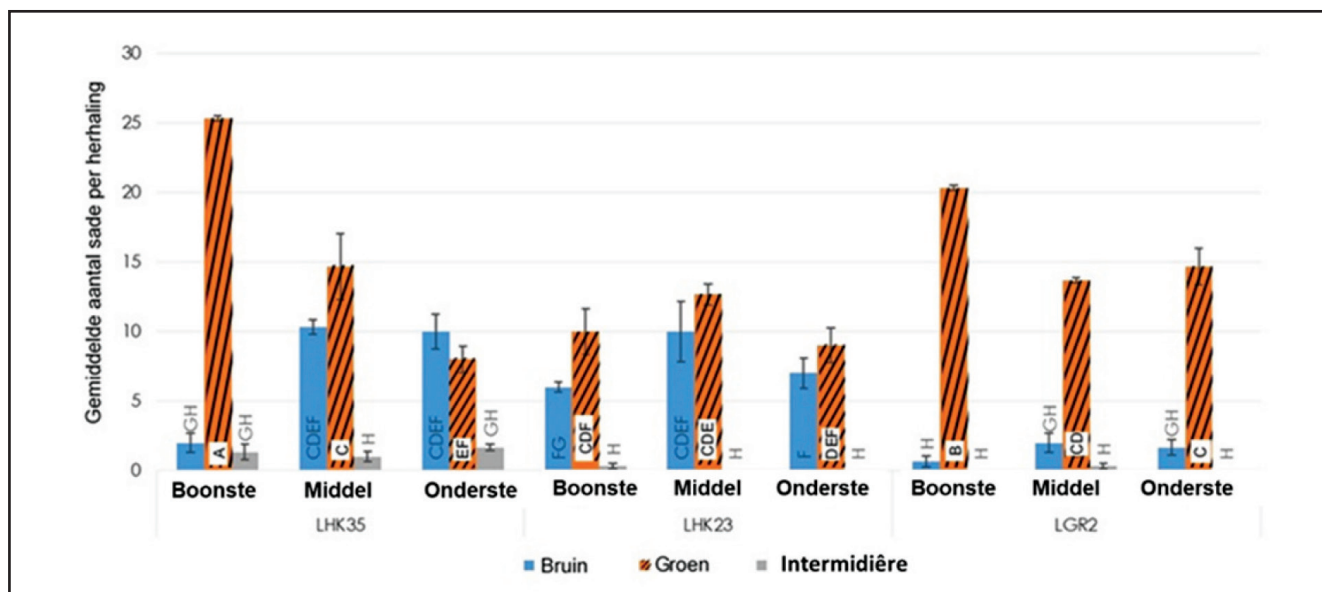
Vergelyking van spesies

Statisties betekenisvolle interaksies was tussen peulposisie, saadkleur, spesies en klone binne spesies waargeneem. Die gemiddeldes vir spesieklone het bewys dat daar meer groen as bruin of intermediêre sade geproduseer word vir alle peulposisies (Fig. 5). Die enigste ander waarskynlike

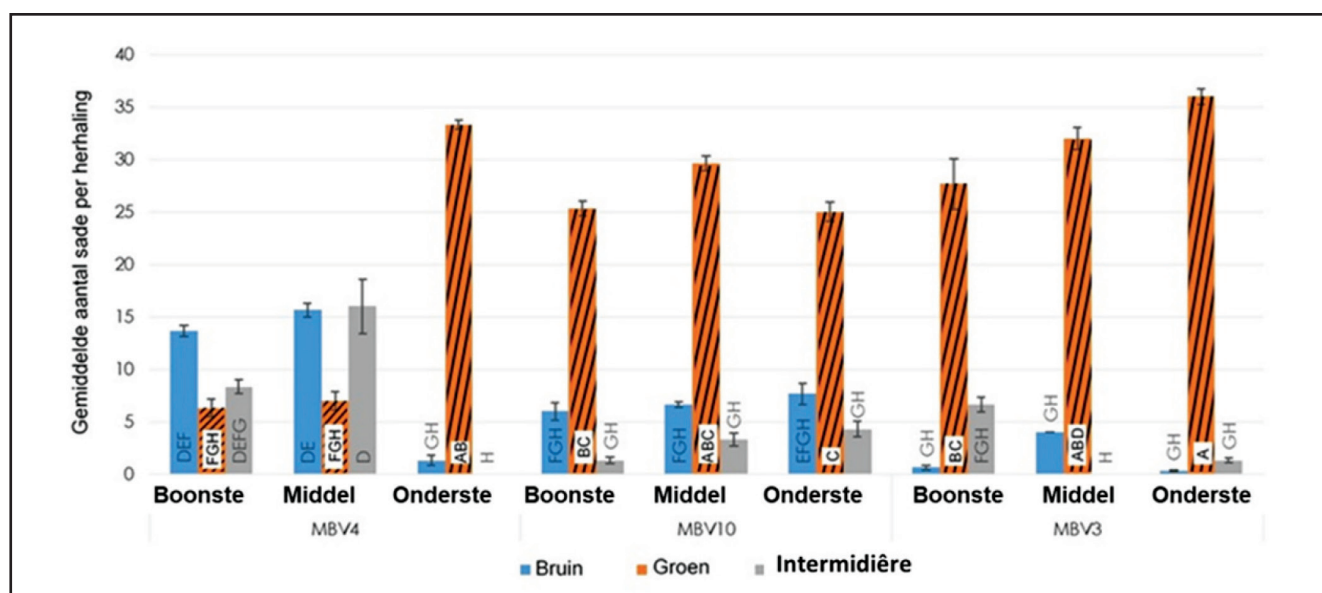
ooreenkoms in die patroon van interaksie vir peulposisie en saadkleur tussen die spesies was 'n geringe neiging vir 'n groter aantal bruin sade wat by die middelste posisie vir beide spesies geproduseer word (Fig. 5).

Vergelyking van klone

Daar was heelwat variasie in die verhouding van dimorfiese saad wat by die verskillende posisies geproduseer is en is by die klone van beide spesies waargeneem (Fig. 6-7). Daar is geen vaste patroon in saadkleurverspreiding in verhouding tot peulposisie tussen die klone van die spesies waargeneem nie. Die grootse aantal groen sade was vanaf die boonste posisies versamel in twee van die drie klone vir *C. longifolia* (Fig. 6), en vanaf die onderste posisie vir twee van die drie klone vir *C. maculata* (Fig. 7).



FIGUUR 6: Gemiddelde aantal *Cyclopiopsis longifolia* sade per kloon per herhaling (vyf peule) versamel, saamgevoegde spesie interaksies tussen klone, peulposisie en saadkleur. Gemiddeldes met dieselfde letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0.05$ nie.



FIGUUR 7: Gemiddelde aantal *Cyclopiopsis maculata* sade per kloon per herhaling (vyf peule) versamel, saamgevoegde spesie interaksies tussen klone, peulposisie en saadkleur. Gemiddeldes met dieselfde letter is nie betekenisvol verskillend by $p=0.05$ nie.

Bespreking

Volwasse embrioweefselkultuur

Spesies

Alhoewel *C. maculata* as 'n saadspesie beskou word (Schutte, 1997), kan die lae persentasie saailinge vanaf konvensionele saaimetodes van *C. maculata* saad (38%) waarskynlik aan die teenwoordigheid van 'n mate van fisiologiese saaddormansie in die saadgroep wat getoets was, toegeskryf word. Wanneer die persentasie saailinge vergelyk word met die persentasie plante wat vanaf gedissekteerde *C. maculata* embrios ontwikkel het (94% sien Fig. 2), is die verskil tussen die twee metodes baie duidelik. Dit kan 'n aanduiding van fisiologiese dormansie in

heuningbossaad wees wat eksogeen relatief tot die embrio is – m.a.w. deur die saadhuid en/of endospermweefsel veroorsaak. Dit is ook belangrik om te onthou dat slegs een kloon (MBV4) vir die kweek van embrios van gehidreerde saad gebruik was, terwyl verskeie klone van die oesjaar 2017 in die eksperimente vir kweek van embrios van gedehidreerde saad en konvensionele saaimetodes gebruik was. Dit is dus moontlik dat genotipiese variasie tussen *C. maculata* klone 'n effek op die finale resultaat kon gehad het. Tog was die persentasie plante wat in weefselkultuur van die gemengde klone *C. maculata* saadgroep ontwikkel het, nog steeds baie meer as die persentasie saailinge wat vanaf konvensionele saaimetodes n.l. die positiewe kontrole, verkry is. In die konvensionele saaimetode eksperiment, is ontkiemingspersentasies vir *C. longifolia* en *C.*

subternata relatief hoog, soos wat vir hersaaier spesies verag kan word (Motsa et al., 2017; Schutte, 1997). Nogtans is die aantal plante wat deur volwasse embrioweefselkultuur verkry is, ook hoër as die aantal saailinge wat vanaf konvensionele saaimetodes vir die twee spesies verkry is.

Kouebehandeling

Geen betekenisvolle verskille is tussen die behandelings waargeneem nie, asook geen interaksies tussen die spesies nie. Dit blyk dat kouestratifikasie van gedissekteerde heuningbos embryos onnodig is, alhoewel dalk nuttig as 'n kondisionerende behandeling, omdat fisiologiese dormansie deur die verwydering van embryos uit hul saadhuid/endosperm omseil was. Toekomstige studies met ander heuningbosspesies mag hierdie bevindinge bevestig, soos bv. *C. intermedia*, wat bekend is om fisiologiese dormante saad te produseer (Whitehead en Sutcliffe, 1995).

Effek van saadposisie

Die doel van die hierdie studie was om te bepaal of saad tydens oes volgens kleur onderskei kan word deur bloot die peule vanaf verskillende hoogtes van die plant te groepeer. Alhoewel betekenisvolle statistiese verskille opgemerk is (Fig. 6 en 7), is die effek nie groot genoeg om 'n praktiese verskil aan die probleem om tussen saadkleur te onderskei te maak nie. Genetiese variasie sal moontlik 'n beduidende faktor wees om gedragsverskille in hierdie genus (*Cyclopia*) van poliplöide spesies te bepaal, maar moederplant-veldomgewing interaksie is ook al met uiteenlopende saadeienskappe in ander spesies gekoppel, en moet daarom in ag geneem word (Carta et al., 2016; Gutterman, 2000; Motsa et al., 2018; Penfield en MacGregor, 2016; Postma en Ågren, 2015; Wulff, 2017). Omgewingsfaktore (nl. plaaslike klimaat) wat 'n effek op saadontwikkeling kan hê, sluit fotoperiode en ligintensiteit, hoogte bo seespieël, water stres, en veral temperatuur in (Carta et al., 2016; Gutterman, 2000; Penfield en MacGregor, 2016). Volgens Penfield en MacGregor (2016), kan selfs geringe verskille in moederplant en/of omgewingsfaktore tot saaddimorfisme aanleiding gee, omdat die saadhuid 'n "hoogs plastiese orgaan" is, m.a.w baie reaktief op omgewingsseine (ongeach of dit deur die moedergenotipe of 'n direkte reaksie op die sigoot is). Onlangse studies op heuningbosspesies het sommige van hierdie raaisels begin ontrafel betreffende die blomstruktuur en stuifmeelkragtigheid, wat ook 'n effek op die interaksies tussen bestuiwing en gevolglik suksesvolle bestuiwing kan hê (Koen et al., 2020a; Koen et al., 2020b). Dit is waarskynlik dat 'n komplekse kombinasie van al die bogenoemde faktore verantwoordelik is vir die hoogs veranderlike verhoudings van dimorfiese saad wat tydens oopbestuiwing van heuningbos onder veldkondisies geproduseer word. Toekomstige studies kan die effek van hierdie interaksies op die verhoudings en verspreiding van bruin en groen saadkleur in heuningbos ondersoek. Tans is daar nog te veel onbeantwoorde vrae om 'n ingeligte voorspelling ten opsigte van die primêre veroorsakende faktore te maak.

Gevolgtrekking

In die embrioweefselkultuur eksperiment het *in vitro* kweking deurgaans hoër persentasies plante as konvensionele saaimetodes gelewer, en mag dit tot 'n lewensvatbare alternatief tot ontkieming vir klein saadgroepe aanleiding gee. Saaddormansie is suksesvol deur die verwydering van die saadhuid omseil en dus kouebehandeling (stratifisering) onnodig gemaak. Dit dui daarop dat saaddormansie eksogeen tot die embryo is en verdere studies, word aanbeveel. Die gebruik van gehidreerde saad van volwasse embrioweefselkulture was meer suksesvol as gedehidreerde saad en word aanbeveel. 'n Afhardingsprotokol word nog benodig vir plante wat vanaf embrioweefselkulture verkry is. In hierdie dimorfiese saadstudie is dit bevind dat die verhouding dimorfiese saad wat geproduseer word nie baie deur peulposisie geaffekteer word nie. Daarom sal die verkryging van uniforme saadgroepe van 'n eenvormige kleur nie so maklik wees deur bloot die oesmetode aan te pas nie. Die bepalende faktore wat saadhuiddkleur in heuningbosspesies beïnvloed, moet nog vasgestel word.

Erkenning

Hierdie studie was deur die Departement van Wetenskap en Innovasie (DWI) [Kontrak DST/Con 00023/2015] befonds, asook finansiële ondersteuning is verkry vanaf Tegnologie en Menslike Hulpbronne vir Industrie Program (THRIP) [Toekenning TP14072479871], en die tesouriebefondsing aan die Landbounavorsingsraad (LNR) en Tshwane Universiteit van Tegnologie (TUT).

Verwysings

- Baskin, J.M., Baskin, C.C. 2004. A classification system of seed dormancy. *Seed Science Research* 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1079/SSR2003150>.
- Bester, C., Koen, J. 2017. Manual for propagation of honeybush seedlings and cuttings. 16 pages. Located at: Crop Development Division, Agricultural Research Council, Stellenbosch.
- Brink, C., Postma, A., Jacobs, K. 2017. Rhizobial diversity and function in rooibos (*Aspalathus linearis*) and honeybush (*Cyclopia* spp.) plants: A review. *South African Journal of Botany* 110, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.10.025>.
- Carta, A., Probert, R., Puglia, G., Peruzzi, L., Bedini, G. 2016. Local climate explains degree of seed dormancy in *Hypericum elodes* L. (Hypericaceae). *Plant Biology* 18, 76-82. <https://doi.org/10.1111/plb.12310>.
- Cheplick, G.P., Sung, L.Y. 1998. Effects of maternal nutrient environment and maturation position on seed heteromorphism, germination, and seedling growth in *Triplasis purpurea* (Poaceae). *International Journal of Plant Science* 159(2), 338-350. <https://doi.org/10.1086/297555>.
- Debeaujon, I., Lepiniec, L., Pourcel, L., Routaboul, J.-M. 2018. Seed coat development and dormancy. *Annual Review of Plant Biology*. [accessed October 07 2019]: https://www.researchgate.net/profile/Loic_Lepiniec/publication/227574619_Seed_Coat_Development_and_Dormancy/links/5751b63e08ae17e65ec34208.pdf
- Department of Agriculture Forestry and Fisheries. 2016. Honeybush tea production guideline. DAFF, Pretoria.
- Dewir, Y.H., Murthy, H.N., Ammar, M.H., et al. 2016. In vitro rooting of leguminous plants: Difficulties, alternatives, and strategies for improvement. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 57(4), 311-322. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0060-6>.
- Gutterman, Y. 2000. Maternal effects on seeds during development. In: Fenner M, editor. *Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. CABI Pub, New York, pp. 59-84. <https://doi.org/10.1079/9780851994321.0059>.
- John, J.A., Quenouille, M.H. 1977. *Experiments: Design and Analysis*. 2nd Edition. Charles Griffin and Company LTD, London.

- Joubert, E., Joubert, M.E., Bester, C., De Beer, D., De Lange, J.H. 2011. Honeybush (*Cyclopia* spp.): from local cottage industry to global markets – the catalytic and supporting role of research. *South African Journal of Botany* 77(4), 887–907. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.05.014>.
- Joubert, M., Joubert, L. 2012. Farming with honeybush - general guidelines. (Unpublished training material.) ARC Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch.
- Koen, J. 2015. Germination characteristics of dimorphic honeybush (*Cyclopia* spp.) seed. M.Tech. dissertation, Tshwane University of Technology, Pretoria.
- Koen, J., Slabbert, M.M., Bester, C., Bierman, F. 2017. Germination characteristics of dimorphic honeybush (*Cyclopia* spp.) seed. *South African Journal of Botany* 110, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.03.006>.
- Koen, J., Slabbert, M. M., Booysse, M., Bester, C. 2020a. Honeybush (*Cyclopia* spp.) pollen viability and surface morphology. *South African Journal of Botany*, 128, 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.004>.
- Koen, J., Slabbert, M. M., Booysse, M., Bester, C. 2020b. Honeybush (*Cyclopia* spp.) anther-stigma distance and intraspecific cross compatibilities. *South African Journal of Plant and Soil*, 1–6. <https://doi.org/10.1080/02571862.2020.1815879>.
- Kokotkiewicz, A., Luczkiewicz, M., Hering, A., et al. 2012. Micropropagation of *Cyclopia genistoides*, an endemic South African plant of economic importance. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences* 67(1–2), 65–76. <https://doi.org/10.1515/znc-2012-1-209>.
- Levene, H. 1960. Robust test in the equality of variance, in: Olkin, I. (Ed.), *Contributions to Probability and Statistics*. Stanford University Press, Redwood City.
- McGregor, G.K. 2017. Guidelines for the sustainable harvesting of wild honeybush. Department of Environmental Affairs and Development Planning, Cape Town.
- Monnier, M. 2012. Culture of Zygotic Embryos, in: Thorpe, T.A. (Ed.), *In Vitro Embryogenesis in Plants*. Springer Science and Business Media, Dordrecht.
- Motsa, M.M., Bester, C., Slabbert, M.M., Hannweg, K., Booysse, M. 2018. Flow cytometry: a quick method to determine ploidy levels in honeybush (*Cyclopia* spp.). *Genetic Resources and Crop Evolution* 65(6), 1711–1724. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0648-z>.
- Motsa, M.M., Bester, C., Slabbert, M.M., Ngwenya, M.Z., Booysse, M. 2017. Natural fecundity and germination characteristics of selected *Cyclopia* (Honeybush) species: preliminary findings. *The Journal of Agricultural Science* 9(6), 154–167. <https://doi.org/10.5539/jas.v9n6p154>.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Ott, R.L., Longnecker, M. 2001. *An introduction to statistical methods and data analysis.*, fifth ed. Duxbury Press, Duxbury.
- Penfield, S., MacGregor, D.R. 2016. Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 68(4), 819–825. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw436>.
- Postma, F.M., Ågren, J. 2015. Maternal environment affects the genetic basis of seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology* 24(4), 785–797. <https://doi.org/10.1111/mec.13061>.
- Pratap, A., Choudhary, A.K., Kumar, J. 2010. In vitro techniques towards genetic enhancement of food legumes - a review. *Journal of Food Legumes* 23(3–4), 169–185.
- Sánchez-Romero, C., Perán-Quesada, R., Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. 2007. In vitro rescue of immature avocado (*Persea americana* Mill.) embryos. *Scientia Horticulturae* 111(4), 365–370. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.11.009>.
- Schutte, A.L. 1997. Systematics of the genus *Cyclopia* Vent. (Fabaceae, Podalyrieae). *Edinburgh Journal of Botany* 54(2), 126–133. <https://doi.org/10.1017/S0960428600004005>.
- Shapiro, S.S., Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- Smith, R.H. 2012. *Plant tissue culture: techniques and experiments*. Academic Press, Massachusetts.
- Wang, Z., Luo, Y., Li, X., et al. 2008. Genetic control of floral zygomorphy in pea (*Pisum sativum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(30), 10414–10419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803291105>.
- Whitehead, C.S., Sutcliffe, M. 1995. Effect of low temperatures and different growth regulators on seed germination in *Cyclopia* spp. *The Journal of Plant Physiology* 147(1), 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81421-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81421-5).
- Wooldridge, J., Joubert, M., Booysse, M. 2012. Comparison between the Honeybush species *Cyclopia genistoides* and *C. subternata*. *SA Fruit Journal* 11(5), 46–47.
- Wulff, R.D. 2017. Environmental maternal effects on seed quality and germination, in: Kigel, J. (Ed.), *Seed Development and Germination*. CRC Press, New York. <https://doi.org/10.1201/9780203740071-18>.