

OSNIVANJE ŠUMA: VJEŽBA 2. ODREĐIVANJE VITALITETA ŠUMSKOG SJEMENA S POSEBNIM OSVRTOM NA INDIGOKARMIN I TETRAZOL METODU AK. GOD. 2012/13.

Kod dormantnih vrsta sjemena ili kod sjemena kod kojeg ispitivanje klijavosti relativno dugo traje ne određuje se klijavost, nego vitalitet.

Pod pojmom vitalitet ili «životna sposobnost sjemena» podrazumijeva se broj za život sposobnih sjemenki (B. Regent, 1980.).

Pod pojmom «klijavost sjemena» podrazumijeva se broj sjemenki ispitivane vrste uzetih iz komponente čistog sjemena, koje su normalno isključale u određenim uvjetima i u određenom roku, izražen u postotku od ukupnog broja sjemenki uzetih u ispitivanje iz komponente čistog sjemena.(B. Regent, 1980.).

Test «klijavosti» definiran je kao metoda za mjerenje postotka sjemena koje je sposobno da se razvije u «normalne klijanke» (tj. ima sposobnost klijanja).

Najvažnija razlika između testova klijavosti i vitaliteta je da test «klijavosti» **mjeri «trenutno stanje»** (tj. sjeme koje je «proključalo»), dok test «vitaliteta» daje **procjenu «moguće potencijalne klijavosti»**. To znači da iako «vitalno» sjeme ima sposobnost razvoja u «normalne» klijanke, ono ne mora nužno imati sposobnost klijanja. Zaključak je da «test klijavosti» ne mjeri istu sposobnost kao i «test vitaliteta», te «klijavost» i «vitalitet» **nisu sinonimi** (Peter G. Gosling, Forestry Commission Research Agency, Velika Britanija).

Testom klijavosti sjemena gotovo uvijek se dobivaju kompleksniji i niži rezultati u odnosu na testove vitaliteta (tetrazol, itd.)

Metode za brzo određivanje vitaliteta šumskog sjemena možemo svrstati u 5 osnovnih skupina:

I *Mehaničke metode:*

- a) metoda na prerez,
- b) metoda potapanja u vodi;

II *Biokemijske metode*

A) obojavanje mrtvih sjemenki:

- a) **indigokarmin metoda**,
- b) metoda kiselog fuksina;

B) obojavanje živih sjemenki

- a) Dimitriewiczewa metoda,
- b) Metoda selena i telura,
- c) **Metoda tetrazola;**

III *Radiografska metoda;*

IV *Metoda rastenja oslobođenih embrija;*

V *Razne druge metode.*

Zbog svoje praktičnosti, danas su u najčešćoj uporabi tetrazol i indigokarmin metoda.

Indigokarmin metoda-bojanje mrtvih sjemenki

Ovu je metodu pronašao i 1925. godine opisao Neljubov. Metoda je od početka bila prilagođena kako za poljoprivredne tako i za šumske vrste. Neljubov je uočio da razrijeđena otopina indigokarmina prodire u mrtve stanice i boji ih intenzivno plavo, ali da za vrijeme od nekoliko sati ne prodire u žive stanice i one ostaje nebojene.

Postupak za primjenu:

- a) ispitivanje se vrši u pravilu na 4x100 sjemenki (4x50 kod veoma krupnog sjemena)
- b) prije tretiranja indigokarmin otopinom, sjeme se preparira na načine koji su propisani za pojedinu vrstu sjemena (najčešće je to močenje u destiliranoj vodi u trajanju od 24 sata). Nakon toga, vrši se oslobađanje embrija i endosperma (kod vrsta koje ga imaju)
- c) oslobođeni embriji/endospermi tretiraju se 0,5 % ili 1%-tnom otopinom indigokarmina u destiliranoj vodi, u termostatu, u tami na temperaturi od +30 °C, zatim se izvade, isperu i klasificiraju. Prije procjene, obojano sjeme mora se temeljito oprati vodom.

Pravila za ispitivanje sjemena indigokarmin metodom sadrže tri klasifikacijska kriterija:

A. Sjeme četinjača: samo se sjeme sa potpuno neobojenim embrijem ili embrijem sa malim obojenim područjem na krajnjem vrhu radikule (sjemenskog korjenčića), smatra vitalnim.

B. Sjeme vrsta iz roda Acer: sjeme sa potpuno neobojenim embrijem ili embrijem sa malim obojenim područjem na vrhu radikule (sjemenskog korjenčića), slabo obojeni embriji i oni kod kojih nekroza na kotiledonima nije spojena sa radikulom koja mora biti neobojena, smatraju se vitalnima.

C. Sve druge vrste: sjeme sa potpuno neobojenim embrijem, ili sa malim obojenim područjem na vrhu radikule (sjemenskog korjenčića), slabo obojeni embriji i embriji koji su nekrotično obojeni na polovici (sredini) kotiledona, suprotno od radikule, smatraju se vitalnima.

Prednosti: jeftina, jednostavna za izvođenje

Nedostaci: traži puno iskustva kad je u pitanju procjena.

Tetrazol metoda – bojanje živih sjemenki

Blijedo žuta otopina 2,3,5-trifenil tetrazolklorida ili bromida se reducira djelovanjem vodika koji se stvara u vlažnim tkivima sjemena, kako bi nastala stabilna, svijetlo crvena tvar koju zovemo formazan. Crveno obojano tkivo ili dijelovi organa lako se razlikuju od mrtvih tkiva koja su bez boje. Za sjemenke koje su djelomično obojane, omjer i smještaj neobojenih dijelova u embriju i megagametofitu ili endospermu određuje da li je sjeme vitalno ili nije.

Tetrazol metoda, upotrebljava se za:

- a) dobivanje brze procjene vitaliteta sjemena za koje se pretpostavlja da je dormantno; i
- b) za određivanje vitaliteta sjemena koje nije isključeno na kraju testa klijavosti.

Lakon je 1950. godine prvi upotrijebio soli tetrazola za određivanje vitaliteta šumskog sjemena, a 1954. razradio metode za prepariranje, tretiranje i klasificiranje sjemena. Preporučio je da se vitalitet sjemena četinjača ocjenjuje prema obojenosti i embrija i endosperma, a ne samo embrija.

Tetrazol metoda privukla je pažnju u ISTA (Međunarodnog udruženje za testiranje sjemena) Pravilima iz 1966. godine kada je propisana za većinu vrsta šumskog drveća za čiju je klijavost potrebno 60 i više dana. 1976 godine, metoda se primjenjivala na više od 40 rodova. Danas je metoda tetrazola službeno najviše primjenjivana metoda određivanja vitaliteta. ISTA je 2003. godine izdala priručnik o provođenju tetrazol testa.

Postupak za primjenu:

- a) ispitivanje se vrši u pravilu na 4x100 sjemenki (4x50 kod veoma krupnog sjemena)
- b) prije tretiranja tetrazol otopinom, sjeme se preparira na načine koji su propisani za pojedinu vrstu sjemena (najčešće je to močenje u destiliranoj vodi u trajanju od 24 sata). Nakon toga, vrši se oslobađanje embrija i endosperma (kod vrsta koje ga imaju)
- c) oslobođeni embriji i endospermi (kod listača koje ga imaju) se drže 3-8 sati, najviše 12 sati (četinjače), odnosno 24 sata ili više (listače) u 1%-tnoj neutralnoj (pH 6,5-7) vodenoj otopini tetrazolklorida, u termostatu, u tami, na stalnoj temperaturi od +30°C. Prije procjene, obojano sjeme mora se temeljito oprati vodom.
- d) za sjeme pojedinih vrsta točno su propisani kriteriji prema kojima se vrši klasifikacija embrija i endosperma na vitalne i nevitale.

U svrhu klasifikacije razlikujemo dvije glavne grupe sjemena:

- a) **sjeme sa endospermom** (npr. sve vrste četinjača; *Euonymus*, *Fraxinus*, *Tilia*)

Analizira se obojenje embrija i endosperma. Da takvo sjeme procijenimo kao vitalno, oba embrija i endosperm moraju biti potpuno obojeni. Sjeme sa malim neobojenim mrljama, ukazuje na nekrotično tkivo i ono se može procijeniti kao vitalno ako su glavni dijelovi sjemena potpuno obojeni.

Mogu se dopustiti jedino male, neobojene površine hranjivog staničja, jer u protivnom neće biti dostatna količina hranjiva na raspolaganju embriju tijekom njegovog rasta.

b) **sjeme bez endosperma** (npr. *Acer*, *Carpinus*, *Corylus*, *Fagus*, *Prunus*, *Rosa*)

Cijelo sjeme se analizira. Naglasak se stavlja na potpuno i ujednačeno obojenje radikule i plumule, te onog dijela kotiledona blizu radikule na mjestu gdje se nalazi hipokotil. Pravilno obojenje kotiledona također je važno jer je to mjesto gdje se nalaze zalihe hranjiva koje će embrio koristiti tijekom prve faze svog razvoja.

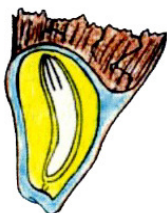
Postoje vrste kod kojih se uočava pojava nebojanja malog dijela radikule. To su vrste iz rodova: *Acer*, *Corylus*, *Cotoneaster*, *Crataegus*, *Elaeagnus*, *Fagus*, *Malus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Rosa* i *Sorbus*. U ISTA Pravilima spominje se 1/4 ili 1/3 vidljivog dijela radikule, te se ovaj kriterij smatra potencijalno zbunjujućim. Zbog toga se preporuča otvoriti mjesto na kojem se nalazi radikula i ustanoviti koliki dio površine nije obojan. Ukoliko se neobojeno područje širi na vitalno kambijalno tkivo, to će utjecati na sposobnost radikule da izraste u primarni korijen, te se takvo sjeme mora procijeniti kao ne vitalno. Ako je meko tkivo na korjenovom vrhu obojeno, rast radikule bit će nesmetan, te se takav embrio ocjenjuje kao vitalan.

Prednosti: jeftina, jednostavna za izvođenje

Nedostaci: služeći se definiranim pravilima, vrlo je teško interpretirati rezultate tetrazol-testa, soli tetrazola su štetne po zdravlje (oprez pri rukovanju), pojedine vrste nisu navedene u pravilima

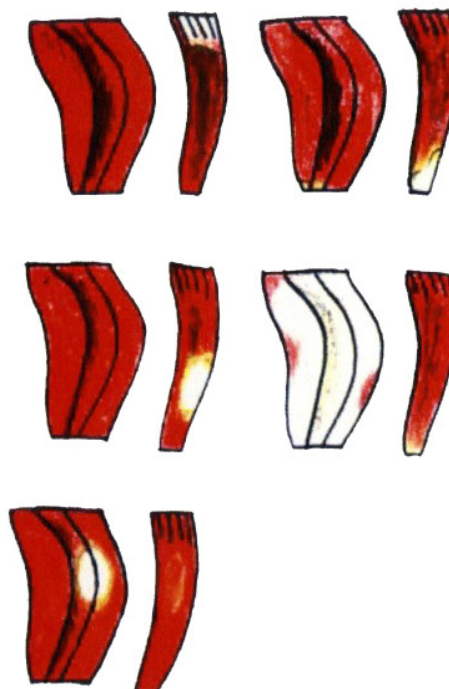
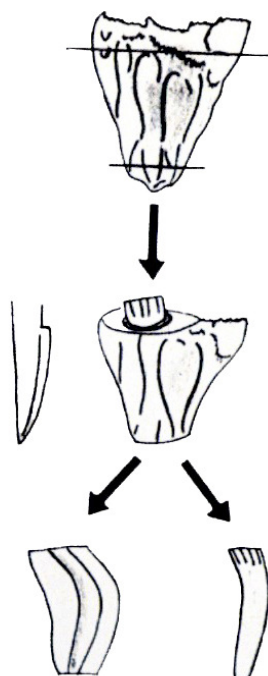
Postupak provođenja tetrazol testa kod određivanja vitaliteta pojedinih vrsta šumskog sjemena (prema ISTA pravilima)

1. Rod/Porodica: **Abies**, *Pinaceae*, Jele
2. Pribor: Zdjelice (4x50 ml), igla, skalpel, podložak za pripremu, filtar papir, pinceta, podložak za procjenu, alkohol za čišćenje
3. Postupak pripreme sjemena: Ništa
4. Priprema sjemena prije bojenja: Pripremiti suho sjeme. Prerezati poprečno pri svakom vrhu da se uoči embrijska šupljina. Tretirati TZ sjeme koje je močeno 3 x 10 minuta pod niskim tlakom (niskotlačna pumpa)
5. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
6. Priprema za procjenu: Prerezati uzdužno kroz endosperm, odvojiti embrio, ukloniti sjemenu ljusku
7. Procjena: Najveća dopuštena površina neobojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - sve mora biti obojeno, a dozvoljena je samo mala površinska mrlja na vanjskoj strani endosperma koja ne smije biti spojena s embrijskom šupljinom.
8. Primjedbe: Staro i suho sjeme može dati pouzdanije rezultate ukoliko ga namačemo 48 sati
Alternativne metode objašnjene su u ISTA pravilima, tablica 6A.



Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne vitalnog sjemena

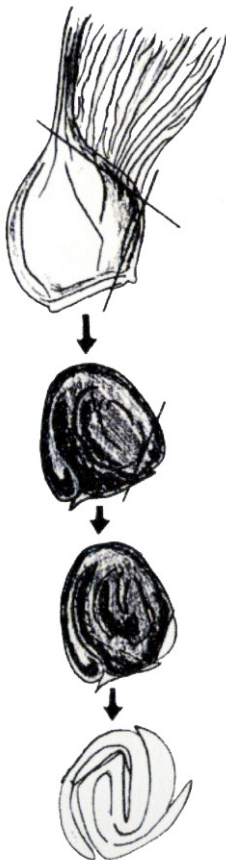


1. Vrsta/Porodica: ***Acer pseudoplatanus***, *Aceraceae*, Gorski javor
2. Pribor: Zdjelice (4x50 ml), igla (lanceta), skalpel, podložak za pripremu, filter papir, pinceta, podložak za procjenu
3. Postupak pripreme sjemena: Močiti 18 sati u vodi temp. 20°C
4. Priprema sjemena prije bojenja: Prerezati perikarp na sve tri strane osim na spoju između dva ploda; odstraniti perikarp. Odrezati mali komadić sjemene ljuske i ponovo močiti 3 sata. Ukloniti sjemenu ljusku.
5. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
6. Priprema za procjenu: Ništa
7. Procjena: Najveća dopuštena površina neobojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - vrh radikule, mala površinska mrlja na kotiledonima, osim u blizini radikule ili hipokotila.
8. Primjedbe: Staro i suho sjeme može dati pouzdanije rezultate ako se prethodno provede hladna stratifikacija između vlažnog papira u trajanju 14 dana na temp. 4 °C.



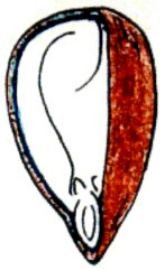
Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne vitalnog sjemena



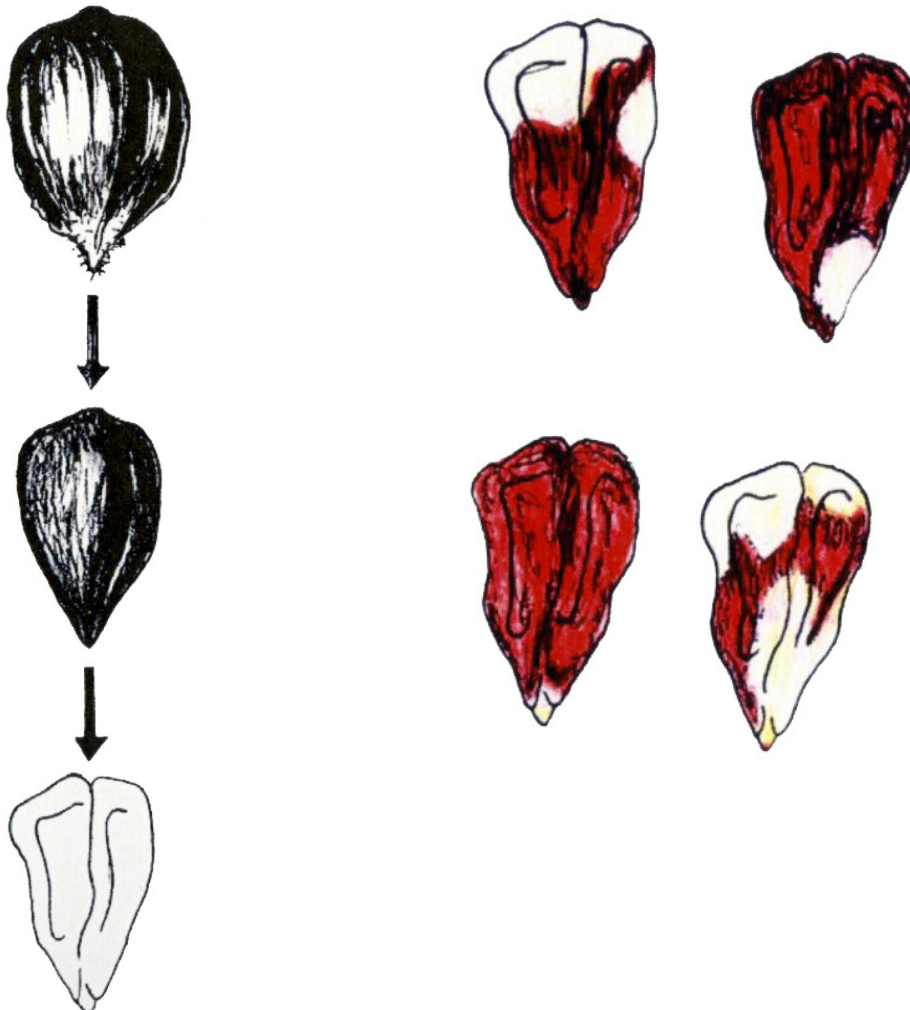
Rod/Porodica: **Fagus**, *Fagaceae*, Bukve

1. Pribor: Zdjelice (4x250 ml), igla, igla (lanceta), skalpel, podložak za pripremu, filter papir, pinceta, podložak za procjenu
2. Priprema sjemena: Odstraniti perikarp suhog sjemena, močiti 18 sati u vodi temp. 20°C
3. Priprema sjemena prije bojenja: Odstraniti sjemenu ljusku
4. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
5. Priprema za procjenu: Otvoriti unutarnju stranu kotiledona
7. Procjena: Najveća dopuštena površina nebojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - vrh radikule, 1/3 vanjske površine kotiledona
8. Primjedbe: Perikarp presušenog sjemena lakše se odstranjuje nakon nekoliko sati močenja

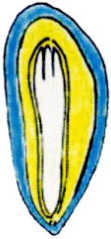


Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne-vitalnog sjemena

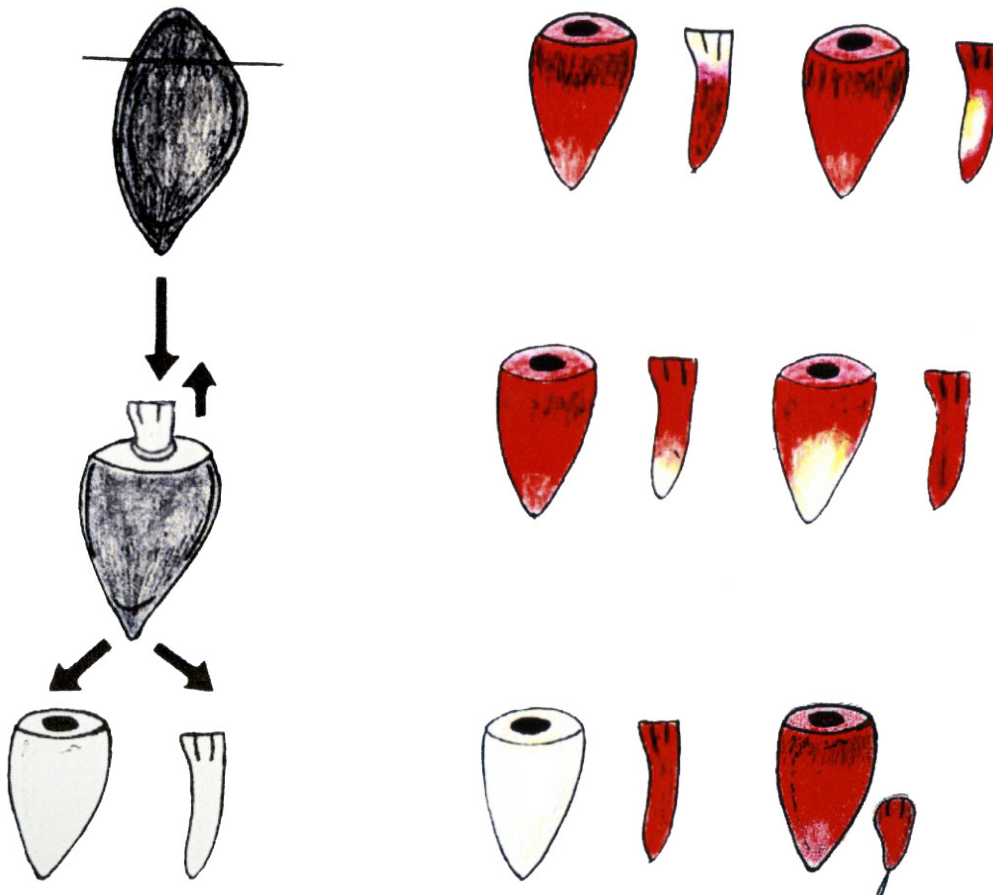


1. Vrsta/Porodica: **Picea**, Pinaceae; Smreke
2. Pribor: Zdjelice (4x50 ml), igla (lanceta), skalpel, podložak za pripremu, filter papir, pinceta, podložak za procjenu
3. Postupak pripreme sjemena: Pripremiti suho sjeme
4. Priprema sjemena prije bojenja: Prerezati poprečno na visini od 1/3 od radikule kako bi otvorili embrijsku šupljinu
5. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
6. Priprema za procjenu: Odvojiti embrio i ukloniti sjemenu ljusku
7. Procjena: Najveća dopuštena površina neobojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti – Sve mora biti obojeno, uključujući endosperm. Dozvoljena je mala površinska nekroza na vanjskom dijelu endosperma koja nesmije biti spojena s embrijskom šupljinom.
8. Primjedbe: Embriji kraći od 1/3 embrijske šupljine procjenjuju se kao ne vitalni.

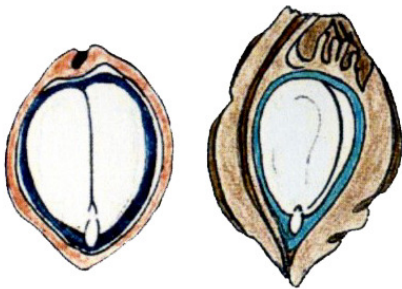


Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne vitalnog sjemena

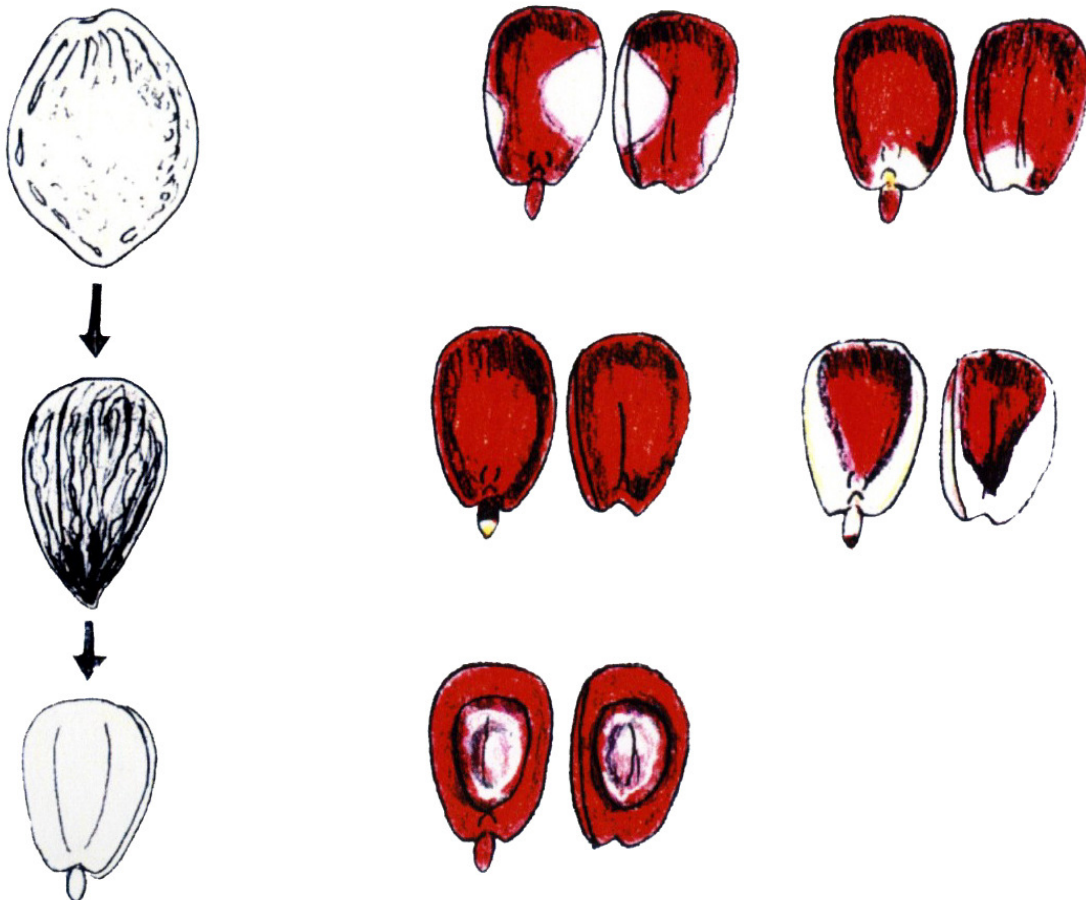


1. Rod/Porodica: **Prunus**, *Rosaceae*, Prunusi
2. Pribor: Zdjelice (4x50 ml za vrste sitnog sjemena; 4x500 ml za vrste krupnog sjemena), igla (lanceta), skalpel, filter papir, pinceta, podložak za procjenu, škripac (klijeshta)
3. Postupak pripreme sjemena: Slomiti košticu, sjeme močiti 18 sati u vodi temp. 20°C, po potrebi mijenjati vodu (miris po gorkom bademu)
4. Priprema sjemena prije bojenja: Ukloniti sjemenu ljusku
5. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
6. Priprema za procjenu: raširiti kotiledone
7. Procjena: Najveća dopuštena površina nebojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - vrh radikule, 1/3 površine kotiledona ako zahvaća periferni dio
8. Primjedbe: Prije procjene, kod vrsta krupnog sjemena (npr: *Prunus armeniaca*, *P. domestica*, *P. persica*, *P. dulcis*, itd.) potrebno je pažljivo raširiti kotiledone.

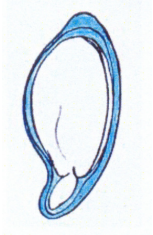


Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne vitalnog sjemena

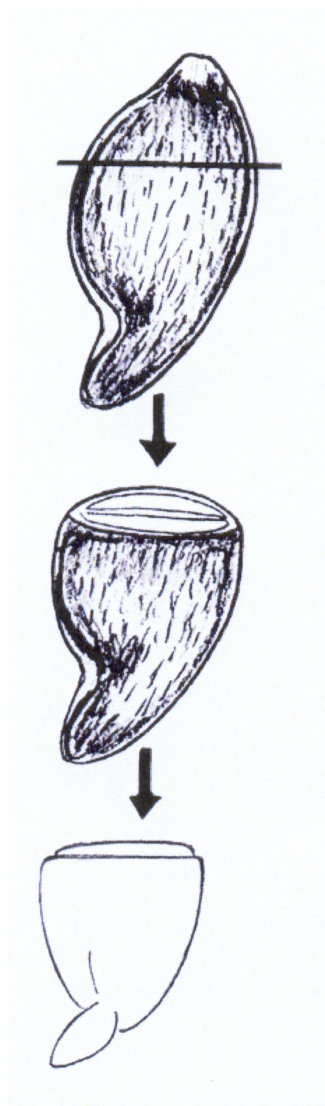


1. Rod/Porodica: **Sorbus**, *Rosaceae*, vrste roda *Sorbus*
2. Pribor: Zdjelice (4x50 ml), igla, igla (lanceta), skalpel, podložak za pripremu, filter papir, pinceta, podložak za procjenu
3. Priprema sjemena: močenje 18 sati u vodi temp. 20°C
4. Priprema sjemena prije bojenja: Prerezati poprečno na visini od 2/3 od radikule
5. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
6. Priprema za procjenu: odvojiti embrio
7. Procjena: Najveća dopuštena površina nebojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - vrh radikule, 1/3 površine kotiledona, 1/2 površine kotiledona ukoliko zahvaća periferni dio
8. Primjedbe: Nema



Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne-vitalnog sjemena



Rod/Porodica: **Tilia**, *Tiliaceae*, Lipe

1. Pribor: Zdjelice (4x50 ml), igla, igla(lanceta), skalpel ili škare, škare za kost (grickalica za nokte), podložak za pripremu, filtar papir, pinceta, podložak za procjenu.
2. Postupak pripreme sjemena: Ukloniti perikarp, odrezati hilum, močiti 18 sati u vodi na temp. 20°C
3. Priprema sjemena prije bojenja: ukloniti sjemenu ljusku
4. Bojenje: 18 sati, 30°C, 1,0% TZ-otopina
5. Priprema za procjenu: Sa malim rezom otvoriti endosperm i odvojiti embrio
6. Procjena: Najveća dopuštena površina neobojenog, mekanog i/ili nekrotičnog tkiva može biti - sve mora biti obojeno, a dozvoljena je mala nekroza na rubovima endosperma samo ako zahvaća površinski dio
7. Primjedbe: Nema



Slika 1: Postupak pripreme

Slika 2: Procjena, primjeri ne vitalnog sjemena

