

FIZIOLOŠKA, KEMIJSKA I ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA SVJEŽEG I USKLADIŠTENOG SJEMENA PINIJE (*Pinus pinea* L.)

PHYSIOLOGICAL, CHEMICAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FRESH
AND STORED STONE PINE SEED (*Pinus pinea* L.)

Tamara JAKOVLJEVIĆ¹, Marija GRADEČKI-POŠTENJAK¹, Ivana RADOJČIĆ REDOVNIKović²

SAŽETAK: *Pinija* (*Pinus pinea* L.) je mediteranska vrsta drveća. Raširena je na cijelom području Sredozemlja. U Hrvatskoj je prirodno rasprostranjena na otoku Mljetu u području Saplnare. Zbog ekonomske, ekološke, pejzažne, nutritivne i zdravstvene vrijednosti mogućnosti korištenja sjemena pinije su velike. U šumarstvu se koristi za pošumljavanje degradiranih staništa mediteranskog krškog područja Hrvatske, a zbog široke kišobranaste krošnje i vrlo dekorativnog izgleda, interesantna je kao hortikulturna vrsta. Nutritivna i zdravstvena vrijednost sjemena proizlazi iz kemijskog sastava. Bogato je proteinima, vitaminima A, B, C, D, E, od minerala željezom, magnezijem, fosforom i cinkom, nezasićenim masnim kiselinama i polifenolnim spojevima. Ispitana je kvaliteta sjemena (klijavost sjemena, masa 1000 sjemenki, sadržaj vlage), kemijski sastav i antioksidativna svojstva unutarnje sjemenske ljuske i sjemena (količina ukupnog sumpora, dušika, sirovog proteina, fosfora, kalija, kalcija, magnezija, bakra, cinka, željeza, mangana i ukupnih polifenola). Fiziološka, kemijska i antioksidativna svojstva ispitana su na svježem sjemenu (3 provenijencije) i na dugoročno uskladištenom sjemenu (1 provenijencija). Sjeme je sabrano na području UŠP Split, svježe sjeme je sabrano 2009. godine, a uskladišteno sjeme je sabrano 1995. godine. Klijavost svježeg sjemena bila je viša od standardom propisane. Provenijencija Mljet imala je nisku energiju klijavosti i najviše učešće šturog sjemena. Uzrok tomu je starost stabala. Učešće svježeg neisklijalog sjemena ukazuje na dormantnost sjemena, a iznosilo je prosječno 9 %. Kod sjemena pinije radi se o tipu mehaničke dormantnosti. Provenijencija Dubrovnik imala je najviše učešće svježeg neisklijalog sjemena. Zdravstveno stanje sjemena svih istraživanih provenijencija bilo je dobro (Tablica 2). Klijavost uskladištenog sjemena provenijencije Zadar u razdoblju od 1995. do 2010. godine, iznosila je prosječno 74 %. (Tablica 3). Značajna količina dušika i sumpora predstavlja pokretačku snagu rasta embrija. Ukupna količina dušika, sumpora, sirovih proteina i fosfora u sjemenu je visoka, dok je u sjemenskoj ljusci niska. Visoke vrijednosti sirovih proteina ukazuju na to da je sjeme pinije bogat izvor proteina (Tablica 4.). Sjemenke su bogate mineralima. Najzastupljeniji element je kalij, a slijede ga fosfor i magnezij. Ostali elementi zastupljeni su ovim slijedom: kalcij, željezo, mangan, cink i bakar. Nije uočena bitna razlika u mineralnom sastavu unutarnje ljuske i sjemena. Provenijencija Mljet (prirodna sastojina) ima najveću količinu svih ispitivanih minerala osim fosfora, jer je sastojina stara (Tablica 5). Istražen je udio ukupnih polifenola i antioksidacijski kapacitet unutarnje sjemenske ljuske i sjemena pinije. Na temelju dobivenih rezultata za udio ukupnih polifenola vidljivo je da istražene provenijencije sadrže različite udjele ukupnih

¹ Dr. sc. Tamara Jakovljević, dr. sc. Marija Gradečki-Poštenjak, Hrvatski šumarski institut, Cvjetno naselje 41, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska, tamaraj@sumins.hr

² Dr. sc. Ivana Radojčić Redovniković, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

polifenola. Koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva dva puta je viša u unutarnjoj sjemenskoj ljusci nego u sjemenu pinije (Slika 3.). Antioksidacijski kapacitet tj. ORAC vrijednosti značajno su veće u uzorcima unutarnje sjemenske ljuske nego u sjemenu (Slika 4). Između vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta određena je i linearna korelacija s visokim koeficijentom determinacije, što ukazuje da su polifenolni spojevi odgovorni za antioksidacijsku aktivnost sjemena (Slika 5). Dobiveni rezultati istraživanja su u skladu s literaturnim podacima istraživanja provedenim u drugim mediteranskim zemljama. Uporaba sjemena pinije u Hrvatskoj je zanemariva, stoga bi bilo potrebno intenzivirati njegovu proizvodnju. Fizička, fiziološka, nutritivna i zdravstvena svojstva sjemena pinije ukazuju na potrebu osnivanja multifunkcionalnih sjemenskih plantaža za proizvodnju sjemena.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, kemijski sastav sjemena, kvaliteta sjemena, *Pinus pinea* L., polifenoli, sjeme pinije, unutarnja sjemenska ljuska

UVOD – Introduction

Pinija (*Pinus pinea* L.) je izrazito mediteranska vrsta drveća. Raširena je na cijelom području Sredozemlja u blizini morskih obala. U zapadnom Sredozemlju prelazi u sjevernu Afriku i na Kanarske otoke, gdje se penje izuzetno i do 1000 m n. v. U Hrvatskoj je prirodno rasprostranjena na otoku Mljetu u području Saplnare (Vidaković, 1982). U svom prirodnom arealu obično prati maslinu. Svjetloljubljiva je vrsta, a glede tla uspijeva na pješćanim, vapnenastim i silikatnim tlima. Izraziti je kserofit. Cvjeta u razdoblju od travnja do lipnja, češer joj dozrijeva u jesen druge godine, a otvara se u trećoj godini. Doživi starost i preko 200 godina. Sjeme pinije zove se pinjol. Prema tipu sjemena s gledišta sabiranja i ekstrakcije, sjeme pinije spada u skupinu pravog sjemena, što znači da se ekstrahira iz češera (Regent, 1980). Kod gotovo svih crnogoričnih vrsta drveća, pravo sjeme ujedno predstavlja i komercijalno sjeme.

Zbog ekonomske, ekološke, pejzažne, nutritivne i zdravstvene vrijednosti, mogućnosti korištenja sjemena pinije (pinjola) su velike. U šumarstvu se koristi za pošumljavanje degradiranih staništa mediteranskog krškog područja Hrvatske, a zbog široke kišobranaste krošnje vrlo dekorativnog izgleda koristi se i kao hortikulturna vrsta (Tomasević, 1995; Topić i dr. 2006). Kvaliteta sjemena je kompleksno svojstvo koje ovisi o velikom broju čimbenika. Čine ju genetska, fizikalna, fiziološka i zdravstvena svojstva sjemena na koja utječu uvjeti tijekom vegetacijskog razdoblja (Marcos-Filho i McDonald, 1998), proces dorade (Schaffer i Vanderlip, 1999) te uvjeti i dužina skladištenja (Saxena i dr. 1987, Vieira i dr. 2001).

Strukturu sjemena pinije čine sljedeći dijelovi: vanjska sjemenska ljuska koja je tvrda i inkrustrirana (a), membranasta unutarnja sjemenska ljuska (b), endosperm (c) i embrij ili klica (d) (Slika 2.). Često puta, kod sjemena postoje dvije sjemenske ljuske, vanjska i unutarnja, kao što je slučaj i kod pinjola. Glavna zadaća sjemenske ljuske je da štiti sjeme od nepovoljnih vanjskih utjecaja te da regulira komunikaciju sjemena s okolinom. Embrij ili klica predstavlja malu, potpunu biljčicu iz koje će se razviti nova biljka (klijanac). Embrij je smješten u embrionalnoj šupljini u endospermu. Endosperm je smješten unutar sjemenske ljuske i predstavlja spremnik hrane (ulje, škrob, proteini, mineralne tvari) koja daje energiju potrebnu za klijanje embrija i za početni razvoj klijanaca.

Nutritivna i zdravstvena vrijednost pinjola proizlazi iz kemijskog sastava. Bogati su proteinima, vitaminima A, B, C, D, E, od minerala željezom, magnezijem, fosforom, selenom i cinkom, nezasićenim masnim kiselinama i polifenolima (Ruggieri i dr. 1998; Nergiz i Dönmez, 2004). Istraživanja su pokazala da polifenolni spojevi u biljnoj hrani štite od kroničnih bolesti, koje uključuju različite tumore, kardiovaskularne bolesti i dijabetes (Scalbert, 2002). Zahvaljujući tim saznanjima, posljednjih su godina istraživanja usmjerena na određivanje udjela i antioksidativnog kapaciteta polifenola u različitim namjernicama biljnog podrijetla, uključujući i orašaste plodove (Kornsteiner i dr. 2006; Pellergini i dr., 2006).

Cilj istraživanja bio je istražiti kvalitetu, mineralni sastav, količinu proteina i antioksidativna svojstva svježeg i uskladištenog sjemena pinije različitih provenijencija.

MATERIJALI I METODE – Material and Methods

Uzorci češera pinije različitih provenijencija sabrani su tijekom srpnja/kolovoza 2009. godine u šumskim sjemenskim objektima na području UŠ Podružnice Split, u šumarijama: Biograd i Dubrovnik,

te u Saplnari na otoku Mljetu. U istraživanje je uključeno i uskladišteno sjeme pinije provenijencije Zadar, koje je bilo sabrano 1995. godine. Od tada je dugoročno uskladišteno u hladnjači Hrvatskog šumarskog in-

stituta u propisanim uvjetima temperature i vlage u sjemenu: temperatura od 0–5 °C, a sadržaj vlage u sjemenu 8 %. U razdoblju od 1995. do 2009. svake je godine kontrolirana kvaliteta sjemena.

U Tablici 1. prikazani su osnovni podaci o istraživačnim provenijencijama sjemena pinije.

Tablica 1. Popis šumskih sjemenskih objekata u kojima su sakupljeni češeri

Table 1 List of forest seed stands where cones were collected

UŠP Split Šumarija <i>Forest enterprise Split Forest office</i>	Gospodarska jedinica, odjel/odsjek <i>Management unit, compartment</i>	Reg. oznaka šumskog sjemenskog objekta <i>Register number of seed stands</i>	Provenijencija <i>Provenance</i>	Kategorija sjemena <i>Seed category</i>	Godina sabiranja <i>Year of collecting</i>	Starost sastojine (godina) <i>Stand age (years)</i>
Biograd	Biograd 7. četa	SI-III-544/1993.	Biograd	poznato podrijetlo	2009.	50 - 60
Dubrovnik	Štedrica 1d, 1f	SS-III-602/2001.	Dubrovnik	selekcionirano	2009.	30 - 40
Dubrovnik	Saplunara - Mljet	zaštićeni krajolik	Mljet	poznato podrijetlo	2009.	> 120
Zadar	Nin - Kožino - Briševo	PSS-III-528/1978.	Zadar	selekcionirano	1995.	60 - 80

Na svakoj provenijenciji sabrano je 15 kg češera s ukupno 5 stabala. Sabrani češeri su ručno istrušeni u laboratoriju. Za potrebe ovih istraživanja odvojen je 1 kg normalno razvijenog sjemena.



Slika 1. Češer i sjeme pinije

Figure 1 Cone and stone pine seeds

(Foto – Photo: M. Gradečki-Poštenjak)

Kvaliteta sjemena – Seed quality

Kvaliteta sjemena određena je prema međunarodnoj metodologiji – ISTA Rules (2010) koju propisuje Među-

narodna udruga za testiranje sjemena (International Seed Testing Association – ISTA). Ispitana su sljedeća fizička i fiziološka svojstva kvalitete sjemena: masa 1000 sjemenki, sadržaj vlage u sjemenu te energija klijavosti i klijavost sjemena. Klijavost sjemena podrazumijeva broj sjemenki koje su normalno isključile u propisanim laboratorijskim uvjetima i u propisanom vremenskom roku, a energija klijavosti podrazumijeva broj sjemenki koje su isključile u kraćem roku od onoga koji je propisan za klijavost određene vrste. Prilikom ispitivanja klijavosti sjemena u uzorku se utvrđuju sljedeće kategorije sjemena: klijavo sjeme, šturo sjeme, bolesno i gnjilo sjeme te svježe neisklijalo sjeme. Njihovo učešće izražava se u postotku od ukupnog broja sjemenki u uzorku. Analiza pojedinih svojstava kvalitete sjemena provedena je na radnim uzorcima. Veličina radnog uzorka propisana je prema ISTA Rules. Radni uzorci su uzorci na kojima se



Slika 2. Dijelovi sjemena pinije

Figure 2 Parts of stone pine seed

(Foto – Photo: Anonimus)

provodi ispitivanja i razlikuju se u veličini od metode do metode (ISTA Rules, 2010.)

Kemijski sastav sjemena – *Chemical composition of seed*

Za određivanje kemijskog sastava i antioksidativne aktivnosti na sjemenkama pinije odvojeni su posebno: unutarnja sjemenska ljuska i sjeme. Prije mljevenja uzorci su sušeni 24 sata na 80 °C, samljeveni do veličine 0,20 mm na mlin IKA M10 (UN EC ICP, 2007). Za potrebe određivanja fosfora, kalija, kalcija, magnezija, cinka, bakra, željeza i mangana odvagano je 0,50 g uzoraka te je provedena digestija sa 96 % sulfatnom kiselinom, uz dodatak par kapi 60 % perklorne kiseline pri sobnoj temperaturi (UN EC ICP, 2007). Ukupni fosfor određen je na UV/VIS spektrofotometru PE Lambda 1A pri apsorpcijskom maksimumu od 890 nm. Količina kalija, kalcija, magnezija, cinka, bakra, željeza i mangana određena je na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru PE (Perkin-Elmer, 1999).

Na elementarnom analizatoru SC 132 određena je količina sumpora, a na elementarnom analizatoru CNS 2000 određena je količina dušika i ugljika (Leco, 2000). Analiza je provedena suhim spaljivanjem uzoraka bez prethodne kemijske pripreme tzv. “elementarnom analizom” (ISO 10694, 1995). Spaljivanje uzoraka na elementarnim analizatorima provedeno je pri temperaturi od 1350 °C u struji kisika analitičke čistoće (Leco, 2002).

Sirovi proteini utvrđeni su na osnovi količine ukupnog dušika umnožene specifičnim konverzijskim faktorom tzv. “Jones faktor”. Količina sirovih proteina izračunata je korištenjem konverzijskog faktora. Kad specifičan faktor nije poznat, općenito se koristi konverzijski faktor 6.25 (FAO, 2007). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju ponavljanja ± standardna devijacija (Miller i Miller, 2005).

Ekstrakcija polifenola – *Extraction of polyphenols*

Za ekstrakciju polifenola formirani su uzorci sjemena pinije na način da je odijeljena unutarnja sjemenska ljuska od sjemena (embrija i endosperma). Uzorci (unutarnja sjemenska ljuska i sjeme) su sušeni, samljeveni te odmašćeni. Provedena je trostruka ekstrakcija s heksanom (1:5 w/v, 15 min × 3) pri sobnoj temperaturi, a zaostali talog centrifugiran 10 min pri 5000 ° min⁻¹ (Hettich Zentrifugen EBA 20, Germany). Supernatanti su oddekanirani i odbačeni, a dobiveni talozi su prosušeni na sobnoj temperaturi kroz 12 h. Za ekstrakciju polifenolnih spojeva upotrijebljeno je 0,50 g odmašćenog uzorka ljuske (DPPS) i jezgre (DPPK), a ekstrakcija je provedena sa 70 % metanolom (5 mL × 2) kroz 15 min. Ekstrakt je centrifugiran 10 min pri 5000 ° min⁻¹, a supernatanti su spojeni i razrijeđeni do 10 mL sa 70 % metanolom i spremljeni u hladnjak na –18 °C i čuvani do daljnje analize (Mazor Jolić i sur., 2011).

Određivanje ukupnih polifenola – *Determination of total phenolics*

Spektrometrijsko određivanje ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteu reagensa provedeno je prema metodi koju su opisali Singleton i Rossi (1995). Na 0,50 mL polifenolnog ekstrakta dodano je 2,50 mL FC reagensa razrijeđenog 10 puta i potom ostavljeno stajati 5 min. Zatim je dodano mL Na₂CO₃ (75g L⁻¹) i sve se zagrijavalo 5 min pri 50 °C. Reakcija je brzo zaustavljena u ledenoj kupelji te je na UV/VIS spektrofotometru (Cary 3, Varian, Palo Alto, USA) izmjerena apsorbanca pri λ=760nm. Za izračunavanje mase koncentracije polifenola korištena je galna kiselina (pet točka za baždarnu krivulju, 10 - 50 mg L⁻¹ galne kiseline u 70 % metanolu). Dobiveni podaci mjerenja izraženi su kao mg ekvivalenta galne kiseline po gramu odmašćenog uzorka sjemena *Pine pinea* L.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti ORAC-metodom – *Antioxidant activity determined by ORAC assay*

Antioksidacijske aktivnosti ORAC-metodom određena je prema metodi Cao i sur. (1993). Otopina za mjerenje (3 mL) sadrži: 2,25 mL 0,04 mM fluoresceina u 0,075 M fosfatnom puferu (pH 7,0) i 0,375 mL razrijeđenog uzorka. Otopine su inkubirane 30 min pri 37 °C. Nakon 30 min dodan je 0,375 mL 152 mM AAPH [2,2-azinobis (2-amidinopropane) dihydrochloride]. Mjerenja su provedena spektrofotometrom Cary Eclipse Spektrofotometar (Varian, Palo Alto, USA) pri I_{ekscitacije} = 485 nm i I_{emisije} = 520 nm pri 37 °C, a promjena intenziteta fluorescencije mjeri se svaku minutu. Za slijepu probu umjesto uzorka dodano je 0,375 mL 0,075 M¹ fosfatnog pufera. Standard za kalibracijsku krivulju za određivanje ORAC-vrijednosti je Trolox. Iz pripremljene 0,5 mM otopine Troloxa pripravljena su 6 razrijeđenja. Mjerenja ORAC-vrijednosti provedena su na isti način kao i za uzorak. ORAC vrijednost izračunata je prema formuli:

Relativna ORAC vrijednost =

$$\left(\frac{AUC_U - AUC_{SP}}{AUC_{TRX} - AUC_{SP}} \right) \times k \times a \times h \quad (1)$$

[μmol Trolox ekvivalent g⁻¹ uzorka]

$$\text{➤ } AUC = 0,5 + (R_2/R_1) + (R_3/R_1) + \dots + (R_n/R_1) \quad (2)$$

➤ AUC_U = antioksidacijski kapacitet uzorka

➤ AUC_{SP} = antioksidacijski kapacitet slijepe probe

➤ AUC_{TRX} = antioksidacijski kapacitet Troloxa

➤ k = faktor razrijeđenja

➤ a = molarna koncentracija Troloxa

$$\text{➤ } h = \frac{V_{\text{ekstrakta}}}{g_{\text{uzorka}}}$$

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti dvaju ponavljanja \pm standardna devijacija. Svi parametri, kao i grafički prikazi, sačinjeni su korištenjem programa EXCEL.

REZULTATI I RASPRAVA – Results and Discussion

Rezultati istraživanja pojedinih svojstava kvalitete svježeg sjemena različitih provenijencija prikazani su u Tablici 2.

Krupnoća sjemena važno je svojstvo sjemena u rasadničkoj proizvodnji, jer najkrupnije sjeme daje i najveće sadnice (Vidaković, 1985). Najkrupnije sjeme (Tablica 2) imala je provenijencija Biograd s masom 1000 sjemenski od 891 g, a najsitnije provenijencija Mljet s masom 1000 sjemenki od 410 g. Krupnoća češera i sjemena povezana je i sa starošću sastojine, odnosno stabala, te sa stupnjem degradiranosti sastojine. Stare i degradirane sastojine proizvode male češere s najlakšim sjemenom, a učešće šturog sjemena je veće (Bazzas i dr., 2000). Osim toga, stare sastojine proizvode sjeme niže klijavosti nego mlade sastojine (Frankis 1999, Escudero i dr. 2002, Court-Picon i dr. 2004). Najvišu klijavost imala je provenijencija Biograd (80 %). Provenijencija Dubrovnik imala je najnižu klijavost (65 %), iako je najmlađa sastojina. Na klijavosti sjemena također utječu periodicitet plodonošenja i stupanj uroda. U godinama dobrog uroda klijavost sjemena je viša (Regent 1980, Gradečki 2002). Za provenijenciju Dubrovnik 2009. godina bila je godina lošeg uroda, što se odrazilo i na klijavost. Prosječna vrijednost klijavosti svježeg sjemena pinije za sve četiri provenijencije iznosila je 73 % i bila je viša od minimalne, standardom propisane koja iznosi 60 %.

Provenijencije Biograd, Dubrovnik i Mljet, imale su nisku energiju klijavosti sjemena, a klijanje sjemena bilo je usporeno. To ukazuje da starost stabala, odnosno sastojina, utječe na brzinu klijavosti sjemena (provenijencija Mljet), te na prisutnost dormantnosti sjemena (provenijencije Biograd i Dubrovnik), (Frankis, 1999, Roberts, 1972). Kod pinjola se radi o tipu mehaničke dormantnosti, kojoj je uzrok nepropusnost i tvrdoća vanjske sjemenske ljuske (Regent, 1980, ISTA, 1991). Na dormantnost sjemena također ukazuje

Reagensi, standardi i otopine pripremljeni su s ultracistom vodom i kemikalijama analitičke čistoće.

i učešće svježeg neisklijalog sjemena. Energija klijavosti sjemena provenijencije Biograd iznosila je 8 %, a učešće svježeg neisklijalog sjemena 9 %. Provenijencija Dubrovnik imala je energiju klijavosti 0,5 %, i najviše učešće svježeg neisklijalog sjemena 20 %. Tako visok postotak učešća svježeg neisklijalog sjemena značajno je utjecao na visinu klijavosti (65 %).

Učešće šturog sjemena u istraživanim provenijencijama iznosilo je od 2 % (provenijencija Biograd) do 16 % (provenijencija Mljet). Razlog tako visokom učešću šturog sjemena u provenijenciji Mljet je starost stabala, koja iznosi više od 120 godina (Frankis, 1999, Escudero i dr., 2002).

Zdravstveno stanje sjemena svih istraživanih provenijencija bilo je okularno dobro. Učešće bolesnog i gnjilog sjemena kretalo se od 0 % do maksimalno 9 % (Tablica 2).

Klijavost uskladištenog sjemena pinije provenijencije Zadar u razdoblju od 1995. do 2010. godine prikazana je u tablici 3. Tijekom skladištenja kvaliteta sjemena kontrolirana je svake godine. U godini sakupljanja (1995. godina) sjeme je bilo vrlo visoke kvalitete. To je bila godina dobrog uroda češera pinije. Klijavost sjemena iznosila je (91 %), učešće svježeg neisklijalog sjemena iznosilo je 3 %, šturog sjemena nije bilo, a učešće bolesnog i gnjilog sjemena iznosilo je 6 %. Iste godine sjeme je dugoročno uskladišteno. Rezultati ispitivanja klijavosti sjemena u 2010. godini su bili visoki.

Tablica 2. Kvaliteta svježeg sjemena različitih provenijencija
Table 2 Quality of fresh seed of different provenances

Provenijencije Provenance	Kvaliteta sjemena – Seed quality						
	Masa 1000 sjemenki 1000-seed weight (g)	Sadržaj vlage Moisture content (%)	Energija klijavosti Germination rate (%)	Klijavost Germination capacity (%)	Šturo sjeme Empty seed (%)	Svježe neisklijalo sjeme Fresh ungerminated seed (%)	Bolesno i gnjilo sjeme Rotten and decayed seed (%)
Biograd	891	7,2	8	80	2	9	9
Dubrovnik	861	9,7	0,5	65	9	20	6
Mljet	410	7,5	13	73	16	6	5

Tablica 3. Klijavost uskladištenog sjemena po godinama za provenijenciju Zadar
 Table 3 Seed germination of stored seed according to years for Zadar provenances

Godina ispitivanja klijavosti sjemena Year of testing seed germination	Energija klijavosti Germination rate (%)	Klijavost Germination capacity (%)	Šturo sjeme Empty seed (%)	Svježe neisklijalo sjeme Fresh ungerminated seed (%)	Bolesno i gnjilo sjeme Rotten and decayed seed (%)
1995.	26	91	0	3	6
2002.	25	61	11	20	8
2003.	76	94	6	0	0
2004.	25	92	8	0	0
2005.	13	73	17	5	5
2006.	1	66	9	20	5
2007.	0	47	0	18	35
2008.	13	77	0	7	16
2009.	0	55	7	34	4
2010.	0	87	7	1	5
prosječno	17,9	74,3	6,5	10,8	8,4

U tablici 4. prikazane su vrijednosti ukupne količine sumpora, dušika, sirovog proteina i fosfora u sjemenu i unutarnjoj sjemenskoj ljusci. Značajna količina dušika

i sumpora predstavlja pokretačku snagu rasta embrija. Visoke vrijednosti sirovog proteina ukazuju na to je sjeme pinije bogat izvor proteina (Tablica 4).

Tablica 4. Količina ukupnog sumpora, dušika, sirovog proteina i fosfora u unutarnjoj sjemenskoj ljusci (LJ) i sjemenu (S) po različitim provenijencijama

Table 4 Total sulphur, nitrogen, crude protein and phosphorus content in seed coat (LJ) and seed (S) of different provenances

Provenijencija Provenance	Šifra uzorka Sample code	Ukupan sumpor Total sulphur (%)	Ukupan dušik Total nitrogen (%)	Sirovi proteini Crude protein (%)	Fosfor Phosphorus (mg/g)
Biograd	BLJ	0,06±0,01	0,34±0,01	2,13±0,05	0,35±0,05
	BS	0,45±0,01	6,21±0,13	38,81±0,67	9,35±0,10
Dubrovnik	DŠLJ	0,05±0,01	0,35±0,01	2,19±0,05	0,34±0,01
	DŠS	0,48±0,01	5,88±0,18	36,75±0,97	8,51±0,12
Mljet	MSLJ	0,07±0,01	0,40±0,03	2,50±0,18	0,61±0,03
	MSS	0,55±0,02	6,37±0,17	39,81±0,90	9,35±0,13
Zadar	ZKLJ	0,05±0,01	0,26±0,01	1,63±0,01	0,40±0,03
	ZKS	0,54±0,01	6,06±0,05	37,88±0,26	10,46±0,13

* Rezultati su prosijeci dvaju usporednih određivanja ±standardna devijacija

* Results are means ± S.D. (n = 2)

Ukupne količine sumpora, dušika, sirovog proteina i fosfora veće su u sjemenu nego u unutarnjoj sjemenskoj ljusci.

Sjemenke su bogate i mineralima. Najzastupljeniji elementi su kalij i magnezij. Ostali elementi zastupljeni su ovim slijedom: kalcij, željezo, mangan, cink i bakar (Tablica 5). Nema značajne razlike u njihovim vrijednostima u sjemenu i unutarnjoj sjemenskoj ljusci.

Provenijencija Mljet (prirodna sastojina) ima najveću količinu svih ispitivanih minerala osim fosfora, jer je sastojina stara. Analizirano uskladišteno sjeme provenijencije Zadar ne pokazuje odstupanja u kemijskom sastavu u usporedbi sa svježim sjemenom ostalih analiziranih provenijencija

Najveću količinu fosfora, imalo je sjeme najveće klijavosti provenijencije Zadar (uskladišteno sjeme), a najmanju sjeme najmanje klijavosti provenijencije Dubrovnik. Reprodukcijski dijelovi i mlađa tkiva sadrže relativno više anorganskog fosfata. Pokretljivost fosfora je dobra i on se brzo premješta iz manje aktivnih tkiva i organa u mlađe i vitalnije dijelove (Vukadinović, 2010). Fosfor kao esencijalni hranjivi element sudjeluje u brojnim biokemijsko-fiziološkim reakcijama. Najveće potrebe za ovim elementom su upravo u intenzivnom razvoju i kod prijelaza iz vegetacijske u reprodukcijsku fazu.

Dobiveni rezultati udjela ukupnih polifenola kao i odnosi između udjela u ljusci i sjemenu su usporedivi s

Tablica 5. Mineralni sastav u unutarnjoj sjemenskoj ljusci (LJ) i sjemenu (S) po provenijencijama

Table 5 Mineral composition of seed coat (LJ) and seed (S) according to provenances

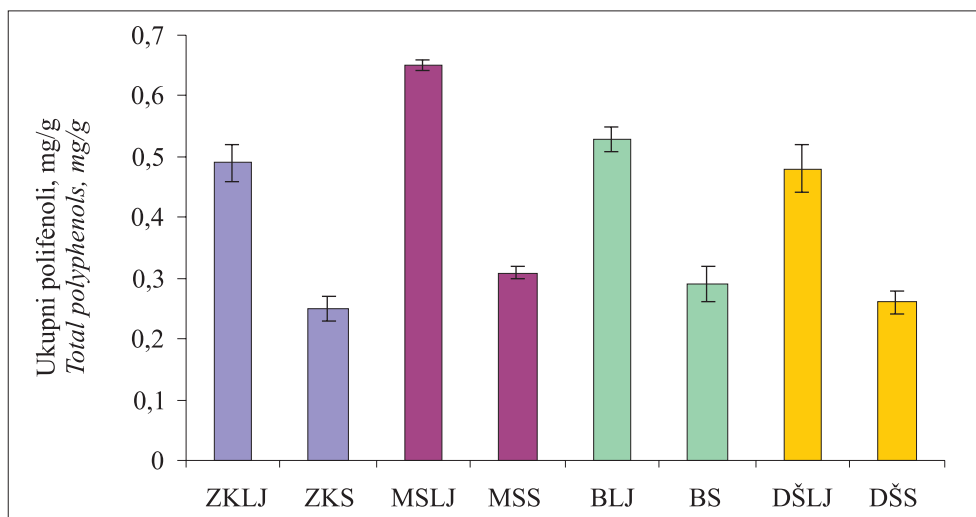
Provenijencija Provenance	Šifra uzorka Sample code	Kalij Potassium (mg/g)	Kalcij Calcium (mg/g)	Magnezij Magnesium (mg/g)	Bakar Copper (mg/kg)	Cink Zinc (mg/kg)	Željezo Iron (mg/kg)	Mangan Manganese (mg/kg)
Biograd	BLJ	7,12±0,11	0,13±0,60	3,20±0,35	15,65±0,25	58,92±0,25	100,25±1,20	68,20±0,65
	BS	7,13±0,13	0,13±0,60	3,24±0,25	15,70±0,20	60,10±0,15	101,12±1,20	68,50±0,50
Dubrovnik	DŠLJ	7,11±0,09	0,11±0,20	3,28±0,30	15,68±0,20	62,15±0,15	99,85±0,80	67,80±0,15
	DŠS	7,13±0,05	0,13±0,09	3,31±0,40	15,70±0,20	52,58±0,15	100,20±0,90	68,00±0,45
Mljet	MSLJ	7,14±0,12	0,14±0,70	3,30±0,55	18,80±0,09	65,50±0,08	102,20±0,20	70,50±0,50
	MSS	7,20±0,10	0,16±0,50	3,38±0,50	19,10±0,10	65,80±0,10	103,00±0,50	71,20±0,65
Zadar	ZKLJ	7,10±0,10	0,12±0,36	3,21±0,30	11,30±0,20	55,65±0,15	98,00±0,20	67,50±0,15
	ZKS	7,14±0,18	0,13±0,40	3,27±0,30	11,35±0,20	56,00±0,05	98,15±0,30	68,00±0,15

* Rezultati su prosjeci dvaju usporednih određivanja ±standardna devijacija

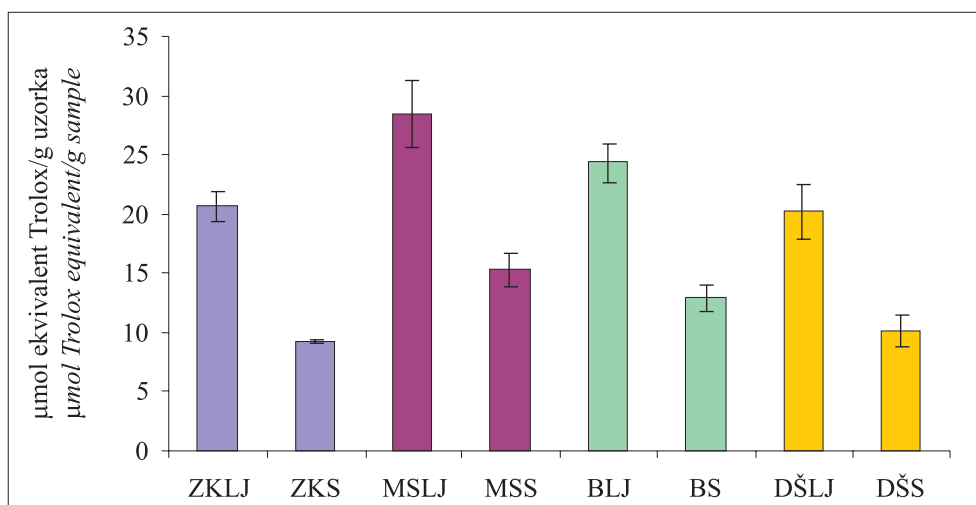
* Results are means ± S.D. (n = 2)

rezultatima u literaturi (Kornsteiner i dr., 2006; Pellergini i dr., 2006, Arcan i Yemenicioğlu, 2009). Između provenijencija najveći udio ukupnih poli-

fenola imalo je sjeme pinije provenijencije Mljeta te sli- jede provenijencije Biograd i Dubrovnik (Slika 3).



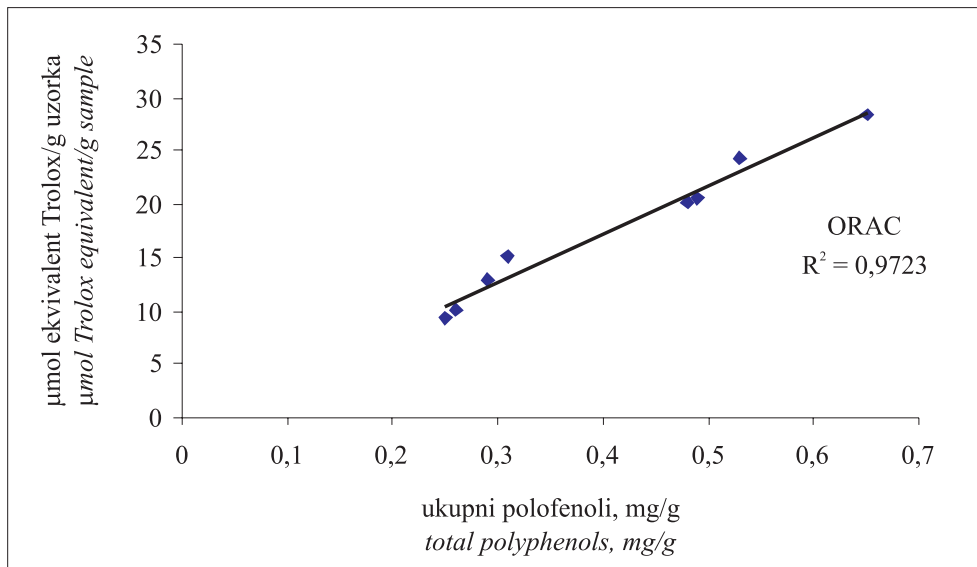
Slika 3. Udjeli ukupnih polifenola u unutarnjoj sjemenskoj ljusci (LJ) i sjemenu (S)
Figure 3 Total phenolic content in seed coat (LJ) and seed (S)



Slika 4. Antioksidacijska aktivnosti određena ORAC metodom u unutarnjoj ljusci (LJ) i sjemenu (S)
Figure 4 Antioxidant activity determined by ORAC assay of seed coat (LJ) and seed (S)

Zanimljivo je da uskladišteno sjeme (15 godina) provenijencije Zadar imalo slične udjele polifenola kao i sjeme pinije provenijencije Dubrovnik. Antioksidacijski kapacitet određen je ORAC metodom. ORAC vrijednosti kretale su se rasponu od 9,31 – 28,36 μmol

Trolox g^{-1} odmašćenog uzorka. Vidljivo je kako su veći antioksidacijski kapacitet imali uzorci unutarnje ljuske nego sjemena pinije. Uzorci koji sadrže veće količine polifenola imaju i veću ORAC vrijednost i najduže sprječavaju pad intenziteta fluorescencije (Slika 4).



Slika 5. Korelacija između antioksidativne aktivnosti (ORAC) i ukupnih polifenola ($n = 8$)
Figure 5 Correlation between antioxidant activity (ORAC) and total polyphenols ($n = 8$)

Između vrijednosti ukupnih polifenola i antioksidacijskog kapaciteta utvrđena je linearna korelacija s visokim koeficijentom determinacije ($R^2=0,9723$), što

ukazuje na to da su polifenolni spojevi odgovorni za antioksidacijsku aktivnost sjemena pinije (Slika 5).

ZAKLJUČCI – Conclusions

- klijavost sjemena svih provenijencija viša je od minimalne, standardom propisane klijavosti
- na brzinu i visinu klijavosti, učešće šturog sjemena te krupnoću češera i sjemena utječu dob i stupanj degradiranosti sastojine, odnosno stabala; mlade sastojine imale su krupnije sjeme veće klijavosti
- sjeme pinije pokazuje znakove dormantnosti, koju uzrokuje tvrda i nepropusna vanjska sjemenska ljuska
- najveću količinu fosfora, ima sjeme najveće klijavosti i energije klijavosti
- ukupne količine sumpora, dušika, sirovog proteina i fosfora veće su u sjemenu nego u unutarnjoj sjemenskoj ljusci

- sjeme je bogato kalijem i magnezijem; ostali zastupljeni minerali su: kalcij, željezo, mangan, cink i bakar; nema značajne razlike u njihovim vrijednostima u sjemenu i unutarnjoj sjemenskoj ljusci
- veći antioksidacijski kapacitet imali su uzorci unutarnje ljuske nego sjemena pinije
- polifenolni spojevi dobro koleriraju s antioksidacijskom aktivnosti sjemena pinije

Zbog nutritivnih i zdravstvenih vrijednosti sjemena pinije potrebno je intenzivirati njegovu proizvodnju. Fizička, fiziološka, nutritivna i zdravstvena svojstva sjemena pinije ukazuju na potrebu osnivanja multifunkcionalnih sjemenskih plantaža za proizvodnju sjemena.

LITERATURA – References

- Arcan, I., A. Yemenicioğlu, 2009: Antioxidant activity and phenolic content of fresh and dry nuts with or without the seed coat *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 184–188.
- Bazzaz, F.A., D. D. Ackerly, E. G. Reekie, 2000. Reproductive allocation in plants. In: Fenner M (ed) *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*, 2nd edn. CAB International, Wallingford.

- Cao, G., H. M. Alessio, R. G. Cutler, 1993: Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 14: 303–311.
- Court-Picon, M., C. Galbin-Henry, M. Roux, 2004: Dendrometry and morphometry of *Pinus pinea* L., in Lower Provenance (France): adaptability and variability of provenances. *For. Ecol. Manage.*, 194: 319–333.

- Escudera, A., F. Perez-Garcia, A. K. Luzuriaga, 2002: Effects of light, temperature and population variability on the germination of seven Spanish pines. *Seed Sci. Res.* 12:261–271.
- FAO, 2007: Chapter 2: Methods of food analysis, <http://www.fao.org/docrep/006/y5022e/y5022e03.htm>.
- Frankis, M. 1999: *Pinus pinea* Linnaeus 1753: <http://www.conifers.org/pi/pin//pinea.htm>.
- Ganatsas, P., M. Tsakalimi, C. Thanos, 2008: Seed and cone diversity and seed germination of *Pinus pinea* in Strofylia Site of the Natura 2000 Network. *Biodivers. Conserv* 17: 2427–2439.
- Gradečki, M. 1999: Uloga i značaj kakvoće sjemena kod njegove uporabe. *Rad. Šumar. inst. Jastrebar.* 34 (1): 95–102, Jastrebarsko.
- Gradečki-Poštenjak, M., 2002: Varijabilnost nekih svojstava obične jele (*Abies alba* Mill.) u dijelu prirodnog rasprostranjenja u Hrvatskoj. Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet, 220 str., Zagreb.
- ISO 10694, 1995: Soil quality – Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)
- Leco corporation, 2000 : Organic application note form No. 203 – 821 – 172, Carbon, Nitrogen and Sulfur in Plant Tissue, St. Joseph, USA.
- Leco corporation, 2002: CNS-2000 Instruction Manual, St. Joseph, USA.
- Nasri, N., A. Khaldi, B. Fady, S. Triki, 2005: Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and population profiling, *Phytochemistry* 66, Str. 1729–1735.
- Nergiz, C., I. Dönmez, 2004: Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seed. *Food Chemistry*, 86, 3: 365–368.
- ISTA, 1991: Tree and shrub seed handbook. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Basserdorf
- ISTA, 2009: International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Basserdorf.
- Kornsteiner, M., K. Wagner, I. Elmadfa, 2006: Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chemistry*. 98: 381–387.
- Marcos-Filho J., M. B. McDonald, 1998: Sensitivity of RAPD analysis, germination and vigour tests to detect the intensity of deterioration of naturally and artificially aged soybean seeds. *Seed Science and Technology*. 26: 141–157, Basserdorf.
- Mazor Jolić, S., I. Radojčić Redovniković, K. Marković, Đ. Ivanec Šipušić, K. Delonga, 2011: Changes of phenolic compounds and antioxidant capacity in cocoa beans processing *International Journal of Food Science & Technology*. *in press*.
- McDonald, M. B., 1998: Seed quality. *Seed Science Research*. 8: 265–275.
- Miller, J. N., J. C. Miller, 2005: Statistics and chemometrics for analytical chemistry, Essex, England.
- Nasri, N., A. Khaldi, B. Fady, S. Triki, 2005: Fatty acids from seeds of *Pinus pinea* L.: Composition and population profiling, *Phytochemistry* 66, Str. 1729–1735.
- Nergiz, C., I. Dönmez, 2004: Chemical composition and nutritive value of *Pinus pinea* L. seed. *Food Chemistry*, 86, 3: 365–368.
- Pellegrini, N., M. Serafini, S. Salvatore, D. Del Rio, M. Bianchi, F. Brighenti, 2006: Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50: 1030–1038.
- Perkin-Elmer, 1999: Manual for Analyses on AAS 3110, New York, USA.
- Regent, B., 1980: Šumsko sjemenarstvo. Jugoslavenski poljoprivredno-šumarski centar – Služba šumske proizvodnje, Beograd.
- Roberts, E. H., 1972: Viability of seeds. Chapman and Hall LTD, London.
- Ruggeri, S., M. Cappelloni, L. Gambelli, S. Nicoli, E. Carnovale, 1998: Chemical composition and nutritive value of nuts grown in Italy. *Ital. Jour. of Food Science* 10, 3, Str. 243–252.
- Savage, G. P., 2001: Chemical composition of walnuts (*Juglans regia* L.) grown in New Zeland, *Plant Foods for Human Nutrition*, 56, Str. 75–82.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventós, 1999: Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants means of Folin Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299: 152–178.
- Tomašević, A., 1995: Komparativni prikaz uspjevanja alepskog bora (*Pinus halepensis* Mill.) i pinije (*Pinus pinea* L.) u mješovitim sastojinama u GJ “Musapstan” šumarija Zadar. *Šumarski list* 1–2: 3–13, Zagreb.
- Tomašević, A., 1993: Pinija (*Pinus pinea* L.) kao vrsta za pošumljavanje krasi. *Šumarski list*: 6–9, CXVIII, 225.
- Topić, V., Z. Đurđević, L. Butorac, G. Jelić, 2006: Utjecaj tipa kontejnera na rast i razvoj sadnica (*Pinus pinea* L.) u rasadniku. *Rad. Šumar. inst. Izvanredni broj* 9: 149–158, Jastrebarsko.

- Saxena, O. P., G. Singh, T. Pakeeraiah, N. Pandey, 1987: Seed deterioration studies in some vegetable seeds. *Acta Horticulturae* 215: 39–44.
- Schaffer, A. F., R. L. Vanderlip, 1999: The effect of conditioning on soybean seed quality. *Journal of Production Agriculture*. 12: 455–459.
- Soobrattee, M. A., V. S. Neergheen, A. Luximon-Ramma, O. I. Aruoma, T. Bahorun, 2005: Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research* 579: 200–213.
- UN EC ICP, 2007: Manual on Sampling and Analyses for leaves and needles, ICP Forests, BWT, Austrija.
- Vidaković, M. 1982: Četinjače – morfologija i varijabilnost. JAZU – Liber, Zagreb.
- Vidaković, M., A. Krstinić, 1985: Genetika i oplemenjivanje šumskog drveća. Sveučilište u Zagrebu. Liber, Zagreb.
- Vukadinović, V., 2010: Fosfor u biljkama, www.pfos.hr/~vladimir/IB/19_Fosfor.ppt (09/07/2010).

SUMMARY: The stone pine (Pinus pinea L.) is typically Mediterranean tree species found along the Mediterranean basin. In Croatia the stone pine is natively distributed on the island of Mljet, the locality Saplnara. The use of these seeds is extensive in the trade, the ecology, the landscape as well as in the nutrition. In the forestry it is used for the reforestation of degraded stands of the Mediterranean Karst region in Croatia. The umbrella shaped crown gives it very decorative form interesting in horticulture. The chemical composition is the reason for nutritive and health values. The seeds are rich in proteins, vitamins A, B, C, D and E, iron, magnesium, phosphorus, zinc, unsaturated fatty acids and polyphenols. In this research qualitative properties of seed (germination capacity, 1000 seed weight, moisture content), the chemical composition and antioxidant properties of seed coat and the seed (amount of total sulphur, total nitrogen and crude protein, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, copper, zinc, iron, manganese and total polyphenols) were investigated.

Physiological, chemical and antioxidant properties were investigated on fresh seed (3 provenances) and stored seed (1 provenance). Fresh seed was collected in 2009 and stored seed was collected in 1995 on the area of Forest Enterprise Split. The germination capacity was higher than the standard value. The provenance Mljet had low germination energy and the highest percentage of empty seed. The reason for this was the age of trees. The percentage of fresh ungerminated seed has shown seed dormancy, and the average was 9%. It was the type of mechanical dormancy. The provenance Dubrovnik had the highest percentage of fresh ungerminated seed. The seed health of all investigated provenance was good (Table 2). The average of germination capacity of stored seed provenance Zadar in the period from 1995 to 2010 was 74% (Table 3). Significant amount of nitrogen and sulphur gives the embryo the power to growth. The total amount of nitrogen, sulphur, crude protein and phosphorus was higher in the seed than in the seed coat. The high amount of crude protein shows that the stone pine seed is good source of proteins (Table 4). Stone pine seeds are rich in minerals, the most abundant element was potassium than phosphorus and magnesium. The other element abundance was as follows: calcium, iron, manganese, zinc and copper. Provenance Mljet (natural stand) had the highest amount of all investigated elements except phosphorus because it was an old stand (Table 5). There is no significant difference of mineral composition in the seed and in the seed coat. The amount of total polyphenols and the antioxidant capacity were investigated in the seed and in the seed coat. From the obtained results of total polyphenols it could be seen that seed from different provenances had different amount of polyphenols. The concentrations of total polyphenols were two times higher in the seed coat than in the seed (Figure 3). Antioxidant capacity i.e. ORAC values were significantly higher in the seed coat than in the seed (Figure 4). The linear correlation with high coefficient of determination was found between total polyphenols and antioxidant capacity (Figure 5). Total polyphenols are responsible for antioxidant activity. Research results are in good agreement with the reported values in other Mediterranean countries.

The use of stone pine seed in Croatia is negligible therefore its production should be increased. Physical, physiological, nutritive and health properties of stone pine seed indicates that the foundation of multifunctional seed orchards would be necessary for seed production.

Key words: antioxidant capacity, chemical composition, seed quality, Pinus pinea L., polyphenols, seed coat, stone pine seed