

ODREĐIVANJE VITALNOSTI SJEMENA JELE ABIES ALBA (L.)

Romana RUTAR*

Izvorni naučni rad
Primljeno: 12-09-1991

IZVOD

Vitalnost sjemena jele određivali smo prema službeno propisanoj metodi ISTA i prema novoj metodici ISTA, tj. sa podtlakom, koji se nakon 10 minuta svede na normalni tlak i to se ponavlja tri puta, nakon čega se sjeme još tri sata namače u tetrazolnoj otopini u tami pri 30° C.

Kod četiriju uzorka, koje je poslala ISTA, postotak vitalnih sjemenki, tj. kada su endosperm i embrio jednako obojeni, značajno se je povećao kod određivanja po novoj metodici, jer se kod ove metode tetrazolna otopina brže i ravnomjernije raspoređuje po vitalnim dijelovima sjemena. Nova metodika omogućuje određivanje već nakon nekoliko sati, dok su kod propisane metode za to potrebna 3 do 4 dana.

DETERMINATION OF VIABILITY OF FIR SEED (*Abies alba* L.)

R. RUTAR

Original scientific paper
Received 12-09-1991

ABSTRACT

Viability of fir seed was determined according to the officially regulated ISTA method and following the new ISTA methodology by using subpressure which is after 10 minutes brought to normal pressure. This is repeated three times, afterwards the seed is soaked in tetrazolium solution for three hours at 30° C in the dark.

In the four fir seed samples sent by ISTA the percentage of viable seed, i.e. endosperm and embryo have the same colour, went up significantly if the new methodology was used since in this method the tetrazolium solution is more rapidly and more evenly distributed on viable seed parts. With the new methodology determination is possible after a few hours while the old prescribed one needs 3 to 4 days.

* RS Kmetijski inštitut Slovenije, 61 000 Ljubljana, Hacquetova 2
Agricultural Institute of Slovenia, Ljubljana, Hacquetova 2

UVOD

Vitalnost ili životna sposobnost sjemena određuje se, prije svega, kod onih vrsta sjemena koje karakterizira dugotrajno mirovanje. Određivanje se odvija pomoću indigokarmin metode, metode rasta embrija i tetrazol metode, koja se najčešće upotrebljava za ocjenjivanje životne sposobnosti sjemena šumskog drveća. Kod ostalih vrsta sjemena vitalnost se određuje u slučaju potrebe po što bržem dobivanju rezultata kvalitete sjemena.

Kod ispitivanja pomoću tetrazol metode, koju je razvio Lakon 1949. godine, vitalnost se određuje pomoću bojenja. Pri tom se upotrebljava 0,1 ili 1% bezbojna vodena otopina 2, 3, 5 — trifeniltetrazoloklorida ili bromida, koji je indikator redukcijskih procesa u živim ćelijama. Kod penetracije otopine u žive ćelije dolazi pomoću encima hidrogenoze do redukcije tetrazolne soli u stabilnu supstanciju trifenolformazan, koja ćelije oboji crveno. Mrtve ćelije, u kojima se ne vrši encimatska aktivnost, ostaju neobojene. Na osnovi mjesta i opsega obojenosti embrija i endosperma ocjenjuje se vitalnost sjemena.

Za pojedine biljne vrste propisane su metode za testiranje vitalnosti sjemena: nekoliko uputstava navedeno je u Sl. listu SFRJ br. 47/87 ali je najviše metoda za velik broj različitih biljnih vrsta navedeno u pravilima međunarodne organizacije za testiranje sjemena — ISTA. Ova organizacija je u godini 1990. svim referentnim laboratorijama poslala uputstva o novoj metodi utvrđivanja vitalnosti sjemena i sjeme jele za testiranje.

MATERIJAL I METODIKA RADA

Sjemenu jele *Abies alba* (L.) često se određuje vitalnost ali propisana metodika ne daje dovoljno zadovoljavajuće rezultate. Zato smo odlučili da ispitamo još i novu metodu na 4 uzorka sjemena jele koje smo dobili od ISTE.

Biokemijsko testiranje izvedeno je sa 4 uzorka u 4 repeticije po 100 sjemena slijedeći dva postupka.

1. Službeno propisana metoda ISTE

Sjeme jele nakon 18-satnog namakanja u vodi odrežemo oštrim skalpelom, bilo na oba kraja poprečno, bilo po cijeloj dužini blizu embrija toliko da se otvori embrionalna zona. Istovremeno treba paziti na prazne, trule i od insekata oštećene sjemenke.

Ovako pripremljeno sjeme 18—48 sati namačemo u 1,0 5 otopini 2, 3, 5 trifenil tetrazoloklorida sa pH vrednošću 6,5—7,5 u tami pri 30°C. U slučaju da se pH otopine ne nalazi u gore navedenim granicama, treba pripremiti pufer prema postupku kojeg određuju propisi. Trajanje bojenja sjemena ovisi o njegovoj starosti i vlazi: suho i staro sjeme namače se i do 48 sati. Zbog lakšeg ocjenjivanja, tetrazolnoj otopini dodaje se i fungicid.

Nakon isteka vremena za bojenje, vitalnost se određuje na taj način da se odstrani sjemenska ovojnica ili da se sjeme prereže uzdužno kroz endosperm i pregleda se obojenost embrija i endosperma. Sjeme je vitalno ako su oba dijela potpuno obojena.

2. Nova metoda

ISTA je predložila novu metodu sa podtlakom koja omogućuje brže i ravnomjernije bojenje sjemena.

Suho sjeme se poprečno odreže na oba kraja, namoči u tetrazolnoj otopini i za 10 minuta izloži podtlaku od 18.600 Pa. Nakon 10 minuta polako ventiliramo 1 minutu kako bi podtlak narastao do normalnog zračnog tlaka. Postupak ponavljamo još dva puta. Sjeme ostavljamo još 3 sata, a može i tokom cijele noći u otopini u tami pri 30°C i nakon toga ocjenjujemo.

Za ocjenjivanje vitalnosti sjeme prerežemo kroz endosperm i ispostavimo embrije. Kriterij obojenja jednak je kao kod prve metodike.

Kod oba postupka pri ocjenjivanju obojenosti sjeme smo svrstali u 8 grupa:

- 1 — sjeme s potpuno obojenim embrijem i endospermom
- 2 — sjeme s potpuno obojenim embrijem i djelomično obojenim endospermom
- 3 — sjeme s djelomično obojenim embrijem i potpuno obojenim endospermom
- 4 — sjeme s djelomično obojenim embrijem i endospermom
- 5 — sjeme s potpuno obojenim embrijem i neobojenim endospermom
- 6 — sjeme s neobojenim embrijem i endospermom
- 7 — prazno sjeme
- 8 — trulo sjeme

Pomoću analize varijance za jednofaktorski pokus i LSD test analizirali smo rezultate grupe s vitalnim sjemenom (embrio i endosperm potpuno su obojeni).

REZULTATI

Među postupcima pomoću kojih je određivana vitalnost sjemena pojavile su se razlike.

Kod metode s podtlakom, u prosjeku, više je sjemenki bez poteškoća klasificirano u grupu sa potpuno obojenim embrijem i endospermom.

Veći postotak sjemenki se je pojavio i u grupi s potpuno obojenim embrijem i djelomično obojenim endospermom.

Manje sjemenki, u usporedbi sa propisanom metodikom, pojavilo se u grupi s djelomično obojenim embrijem i endospermom.

U ostalim grupama nije bilo bitnih razlika između postupaka.

Kod sva četiri uzorka vitalnih sjemenki pokazala se je u postotku statistički signifikantna razlika između postupaka. Uz rizik od 1% može se tvrditi da nova metodika omogućava lakše ocjenjivanje vitalnosti. Tetrazolna otopina se kod nove metodike ravnomjernije i brže raspoređuje po vitalnim djelovima sjemena.

Rezultati oba različita postupka vide se u tabeli 1.

ZAKLJUČCI — REFERENCES

Nova metodika s podtlakom omogućuje jasno i određeno obojenje embrija i endosperma pa je time i ocjenjivanje jednostavnije. Uslijed podtlaka sjeme se, ako je živo, u cjelosti oboji ravnomjerno, pa je u grupu sa potpuno obojenim embrijem i endospermom uvršteno više sjemenki. Pored te prednosti, dobra strana nove metode je i vremenski kraće tretiranje. Pokus traje 1 dan ili 2 (u slučaju da sjeme ostavimo u otopini tokom noći), dok službeno propisana metodika zahtijeva postupak od 3—4 dana. U našem slučaju prema metodi s podtlakom bio je dovoljan 1 dan za cjelokupni postupak, pošto se u tom vremenu sjeme dovoljno obojilo.

Nedostatak propisane metodike sastoji se u tome da, usprkos produženom bojenju, ne dolazi do ravnomjernog raspoređivanja tetrazolne otopine. Mnogo puta naišli smo na slučaj kada je snažno, zdravo sjeme usprkos 48-satnom namakanju u sredini još uvijek neobojeno. Kako iz praktičnog stanovišta ovakvo sjeme, zbog nedostatka u postupku, ne možemo ubrojiti u mrtvo sjeme, pomažemo si tako da embrije izdvojimo iz endosperma a time i iz sjemenske ovojnice i tako odvojene ponovo ih bojimo neko vrijeme i nakon toga ih ocjenjujemo.

Intenzitet obojenosti nije mjerilo za vitalnost. Vitalno sjeme je ono sjeme koje se oboji tamno crveno kao i ono koje je ružičaste boje. U različitim nijansama boje moguće je uočiti samo promijenjenu vitalnost: jako tamno crveno obojeno sjeme nalazi se u fazi umiranja, ali je još uvijek živo.

Tabela 1. Rezultati obojenosti sjemena 4 uzorka jele u %

Grupe prema obojenosti	UZORAK 1			UZORAK 2			UZORAK 3			UZORAK 4		
	N	P	R	N	P	R	N	P	R	N	P	R
1. (E+END)p	48	37	11	45	39	6	32	21	11	52	44	8
2. Ep+ENDd	9	0		6	1		2	0		7	0	
3. Ed+ENDp	0	1		2	1		2	0		2	4	
4. (E+END)d	2	19		4	12		3	15		2	17	
5. Ep+ENDn	0	0		0	0		0	0		0	0	
6. (E+END)n	5	6		5	6		0	0		0	1	
7. prazno sjeme	33	34		36	39		60	62		36	32	
8. trulo sjeme	3	3		2	2		1	2		1	2	

LSD za različite postupke u grupi 1 (E+END)p: $LSD_{0,05} = 2,9$
 $LSD_{0,01} = 3,9$

Legenda: E — embrio
 END — endosperm
 p — potpuno obojeno
 d — djelomično obojeno
 n — neobojeno
 N — nova metoda sa podtlakom
 p — propisana metoda
 R — razlika: N—P

LITERATURA

1. Seed science and technology 1985, Vol. 13, No. 2.
2. Pravilnik o kakovosti semena kmetijskih rastlin, Ur. 1. SFRJ št. 47/87.
3. Roberts E. H. 1972: Viability of Seeds, London.
4. Handbook on Tetrazolium testing, ISTA, Zürich, Switzerland, 1985.