

## **Sposób stymulacji kiełkowania nasion sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris* L.)**

Przedmiotem wynalazku jest sposób stymulacji kiełkowania otoczkowanych nasion sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L.

Nasiona drzew są pierwszym i jakże ważnym elementem w produkcji wysoko jakościowego materiału szkółkarskiego niezbędnego do zapewnienia materiału sadzeniowego na potrzeby odnowienia lasów i zalesień, co jest zasadą zrównoważonej trwałości lasu. Ponadto szczególnie nasiona roślin drzewiastych odgrywają niezwykle ważną rolę w ekosystemie leśnym, gdyż drzewa leśne rzadko obradzają w nasiona, na przykład okresy nasienne sosny zwyczajnej powtarzają się co 2 - 4 lata. Prócz tego problemem utrudniającym ich pozyskanie jest między innymi niewystarczająca ilość słonecznych dni w strefie klimatu umiarkowanego oraz patogeny grzybowe ograniczające rozwój siewek drzew lasotwórczych, w tym sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. Powyższe trudności hodowlane były przyczynkiem do podjęcia badań nad stworzeniem metod przerywania spoczynku bezwzględnych nasion oraz ich przygotowania do hodowli zdrowych sadzonek.

Do zabiegów przerywania spoczynku nasion należą stratyfikacja i skaryfikacja. Stratyfikacja nasion czyli umieszczanie nasion w wilgotnym, chłodnym podłożu okazała się uniwersalną metodą przedsewną wpływającą korzystnie na przerwanie spoczynku oraz zwiększenie frekwencji skielkowanych nasion sosny, podobnie jak u wielu innych gatunków roślin w tym drzew [Wang, Berjak 2000] między innymi ze względu na korzystny wpływ niskich temperatur na pobudzenie poziomu aktywności enzymów [Nikolaeva 1977]. Również skaryfikację nasion czyli celowe uszkodzenie okrywy nasienia w celu ułatwienia przez nie pobierania wody oraz wnikania gazów do jego wnętrza uznaje się za zabieg stymulujący kiełkowanie nasion, w szczególności drzew. Skaryfikacja wpływa bowiem korzystnie na wzrost zarodka poprzez pozbycie się fizycznej bariery w postaci zewnętrznej okrywy nasienia [Duval, NeSmith 1999]. Ważną rolę w wschodzeniu nasion odgrywają także regulatory wzrostu

roślin, z których wiodącą rolę odgrywa giberelina tj. kwas giberelinowy ( $GA_3$ ). Jak pokazują badania Alouani, Bani-Aameur [2004], Chen i in. [2008] oraz Leader [1987] giberelina działa stymulująco na kiełkowanie i rozwój nasion takich gatunków drzew jak dagleżja zielona - *Pseudotsuga menziesii* oraz klon zwyczajny - *Acer platanoides*. Na podstawie nielicznych badań przeprowadzonych między innymi przez Leaden [1987] grupa regulatorów wzrostu - auksyny m.in. kwas indolilo-3-octowy (IAA) wpływają pozytywnie na zwiększenie ilości kiełkujących nasion, w tym sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. Ponadto sam proces kiełkowania nasion jest regulowany przez wiele czynników fizjologicznych. Woda aktywując układy enzymatyczne powoduje rozpoczęcie reakcji metabolicznych, następuje hydroliza substancji zapasowych, które są wykorzystane do syntezy nowych związków komórkowych. Podziały komórek i ich wzrost prowadzą do rozpoczęcia kolejnych faz kiełkowania. Fazy te (imbibicja, kataboliczna i anaboliczna) uwarunkowane są przez różnorodne czynniki zarówno wewnętrzne (m.in. przemiany metaboliczne) jak i zewnętrzne (dostęp światła, tlenu, wody, optymalne podłoże). Dla pewnych gatunków drzew leśnych w tym sosny zwyczajnej nie określono do tej pory optymalnych zewnętrznych warunków świetlnych decydujących o ustaleniu fotoblastyczności nasion.

Zważywszy na fakt, że nasiona drzew leśnych, nie należą do łatwych w kiełkowaniu, a sposoby ułatwiające wschody nasion nie zostały definitywnie opracowane dla nasion sosny zwyczajnej *Pinus sylvestris* L. celem wynalazku było stworzenie skutecznej procedury prowadzącej do inicjacji kiełkowania nasion i w efekcie otrzymania zdrowych sadzonek.

Istota rozwiązania według wynalazku polega na tym, że w pojemniku umieszcza się żwir o uziarnieniu od 0,4 do 0,7 mm oraz pozbawione aparatu lotnego nasiona sosny zwyczajnej, po czym dodaje się regulator wzrostu o stężeniu  $0,01 \text{ mg/dm}^3$  w ilości od 80 do 100 ml na 100 nasion. Następnie pojemnik z zawartością przetrzymuje się w warunkach całkowitej ciemności w temperaturze od 6 do  $8^\circ\text{C}$  przez okres od 18 do 24 dni wstrząsając nim co 24 godziny, po czym nasiona oczyszcza się ze żwiru i rozpoczyna etap otoczkowania, do którego przygotowuje się masę złożoną z materiału pylasto-

ilastego o ziarnach nie większych niż 0,2 mm i wody. W przygotowanej masie otoczkuje się nasiona, po czym suszy je w temperaturze od 19 do 22°C i rozpoczyna etap kiełkowania umieszczając nasiona w przygotowanym podłożu glebowym o pH 5,5 i przy stałej wilgotności powietrza na poziomie od 82 do 88 % i temperaturze od 21 do 23°C naświetla się światłem sztucznym w trybie interwałowym do uzyskania siewek, przy czym czas naświetlania wynosi od 10 do 16 godzin, podczas gdy czas ciemności – od 8 do 14 godzin.

Korzystnie przed użyciem żwir poddaje się sterylizacji.

Korzystnie objętość żwiru stanowi od 50 do 70 % objętości pojemnika.

Korzystnie regulatorem wzrostu jest kwas indilo-3-octowy (IAA) albo kwas giberelinowy (GA<sub>3</sub>) albo mieszanina kwasu indilo-3-octowego (IAA) i kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>) w stosunku 1:1.

Korzystnie przed użyciem materiał pylasto-ilasty poddaje się mieleniu i sterylizacji.

Korzystnie do materiału pylasto-ilastego dodaje się fungicyd z grupy ditiokarbaminianów o stężeniu substancji czynnej wynoszącym 750 g/kg.

Nasiona otoczkuje się ręcznie zanurzając każde z nasion w przygotowanej masie lub mechanicznie.

Korzystnie podłoże glebowe sterylizuje się przed użyciem w temperaturze od 120 do 122°C.

Korzystnie etap kiełkowania przeprowadza się w wentylowanych kiełkownikach wyposażonych w zraszacze.

Kiełkujące nasiona oświetla się światłem czerwono-niebieskim lub światłem białym.

Zaletą rozwiązania według wynalazku jest skuteczność zastosowanych procedur, które pozwalają na uzyskanie prawidłowo wykształconych, zdrowych siewek. Po zastosowaniu zabiegów skaryfikacji i stratyfikacji, otoczkowania nasion i fungicydu otrzymuje się około 31% dobrze wykształconych fizjologicznie siewek sosny zwyczajnej, wybarwionych poprawnie chlorofilem i nieporażonych patogenami oraz zdolnych do dalszego rozwoju w sadzonki. Choć nasiona otoczkowane sosny wykazują w praktyce leśnej dużo niższą frekwencję kiełkowania w porównaniu z nasionami nieotoczkowanymi są one cenione ze względu na większą wartość

gospodarczą. Wykształcone z otoczkowych nasion sadzonki sosny zwyczajnej nadają się do nasadzeń na powierzchniach odnowieniowych w lasach. Jest to istotny aspekt, ponieważ założeniem szkółki jest produkcja wysokiej ilości wartościowego materiału szkółkarskiego potrzebnego na np. wiosenne odnowienia lub poprawki.

Zastosowane zabiegi i metody nie są pracochłonne, m.in. ze względu na ich zmechanizowanie oraz nie generują zbyt dużych kosztów.

Rozwiązanie według wynalazku zilustrowano przykładami wykonania przedstawionymi poniżej.

#### Przykład I

W dwóch szklanych butlach Simax o pojemności 250 ml umieszczono żwir o wielkości frakcji ziarna od 0,4 do 0,7 mm w ilości 150 ml oraz pozbawione aparatu lotnego nasiona *Pinus sylvestris* (po 100 szt. w każdej butli). Następnie wleto do każdej butli ze żwirem i nasionami po 80 do max. 100 ml roztworu regulatorów wzrostu tj. kwas indlilo-3-octowy (IAA) oraz kwas giberelinowy ( $GA_3$ ) w stężeniu 0,01 mg  $dm^{-3}$  każdy. Wypełnione butle trzymano w warunkach całkowitej ciemności, w temperaturze 7°C +/- 1°C i wstrząsano co 24 godziny w celu poddania nasion procesowi skaryfikacji. Cały proces trwał 3 tygodnie. Następnie nasiona oczyszczono ze żwiru celem ich zaotoczkowania. Nasiona sosny zwyczajnej otoczkowano przy użyciu pokrywającego nasiona materiału mineralnego pylasto-ilastego o ziarnach nie większych niż 0,2 mm, który wcześniej został dodatkowo zmielony. Jako spoiwa w procesie otoczkowania użyto wody. Aby otrzymać kulisty kształt i dokładne pokrycie nasion proces otoczkowania wykonano ręcznie zanurzając każde z nasion w przygotowanej masie. Na koniec nasiona wysuszone w temperaturze 21°C. Następnie nasiona umieszczono w kielkownikach zaopatrzonych w oddzielne tace. Na tacach umieszczono wcześniej wysterylizowane w autoklawie w temp. 121°C (20 minut) i schłodzone podłoże glebowe o pH 5,5, do którego wysiano nasiona sosny zwyczajnej. Kielkowniki

posiadały wbudowany system zraszaczy utrzymujący stałą wilgotność powietrza na poziomie 85%. Kiełkowniki umieszczono w specjalnej, wentylowanej obudowie podzielonej na dwie komory z wbudowanymi diodami elektroluminescencyjnymi - light-emitting diode (LED). Wykorzystano dwa rodzaje sztucznego światła i trzy długości tego światła: czerwono-niebieskie oraz białe – zainstalowane w oddzielnych komorach. W obudowie wraz ze światłem oraz automatycznie zaprogramowanym fotoperiodem – w pierwszym wariantcie 12-sto godzinnym, w drugim wariantcie 16-sto godzinnym – umieszczono dwa kiełkowniki (w każdej komorze po jednym). Temperaturę w pomieszczeniu ustalono na poziomie 22°C +/- 1°C.

## Przykład II

W dwóch szklanych butlach Simax o pojemności 100 ml umieszczono wysterylizowany żwir w ilości 60 ml o wielkości frakcji ziarna od 0,4 do 0,7 mm oraz pozbawione aparatu lotnego nasiona *Pinus sylvestris* (po 100 szt. w każdej butli). Następnie wiano do każdej butli ze żwirem i nasionami 20 ml roztworu regulatorów wzrostu to jest kwasu giberelinowego ( $GA_3$ ) w stężeniu 0,01 mg dm<sup>-3</sup>. Wypełnione butle przetrzymuje się w warunkach całkowitej ciemności w temperaturze 7°C +/- 1°C i wstrząsa co 24 godziny w celu poddania nasion procesowi skaryfikacji. Proces ten trwał 3 tygodnie. Następnie nasiona oczyszczono ze żwiru celem ich zaotoczkowania. Nasiona sosny zwyczajnej otoczkowano przy użyciu pokrywającego nasiona materiału mineralnego pylasto-o ziarnach nie większych niż 0,2 mm, który wcześniej został dodatkowo zmielony i do którego dodano wodny roztwór preparatu grzybobójczego (fungicydu) Sadoplon 75 WP o stężeniu substancji czynnej czyli tiuramu wynoszącym 750 g/kg w ilości 50g/ 1000 mL H<sub>2</sub>O. Jako spoiwa w procesie użyto wody. Aby otrzymać kulisty kształt i dokładne pokrycie nasiona proces otoczkowanie wykonano mechanicznie przy pomocy maszyny posiadającej bęben napędzany prądem elektrycznym zmiennym. Bęben urządzenia obracał się ze stałą prędkością, co umożliwiło dokładne pokrycie nasion substancjami otoczkującymi. Na koniec nasiona osuszono w temperaturze 21°C. Następnie nasiona należy poddać kiełkowaniu w kiełkownikach zaopatrzonych w oddzielne tace. Na tacach umieszczono

wcześniej wysterylizowane w autoklawie w temp. 121°C przez 20 minut i schłodzone podłoże glebowe o pH 5,5, do którego wysiano nasiona sosny zwyczajnej. Kiełkowniki miały wbudowany system zraszaczy utrzymujący stałą wilgotność powietrza na poziomie 85%. Kiełkowniki umieszczono w specjalnej, wentylowanej obudowie podzielonej na dwie komory z wbudowanymi diodami elektroluminescencyjnymi - light-emitting diode (LED). Wykorzystano dwa rodzaje sztucznego światła i trzy długości tego światła: czerwono-niebieskie oraz białe – zamontowane w oddzielnych komorach. W obudowie wraz ze światłem oraz automatycznie zaprogramowanym fotoperiodem wynoszącym 12 godzin), umieszczono dwa kiełkowniki (w każdej komorze po jednym). Temperaturę w pomieszczeniu ustalono na poziomie 22°C +/- 1°C. Dodatkowo wyhodowane siewki sosny poddano analizom fizjologicznym pomiaru fluorescencji chlorofilu celem zbadania wpływu czynników wywołujących stres jak np. promieniowanie świetlne na funkcję aparatu asymilacyjnego. Analizy te pozwoliły zaobserwować skutki stresu u sadzonek sosny, które to skutki w późniejszym okresie mogłyby spowodować nieodwracalne zmiany u roślin jak np. redukcję chlorofilu.

### Przykład III

W dwóch szklanych butlach Simax o pojemności 100 ml umieszczono wysterylizowany żwir w ilości 60 ml o wielkości frakcji ziarna od 0,4 do 0,7 mm oraz pozbawione aparatu lotnego nasiona *Pinus sylvestris* (po 100 szt. w każdej butli). Następnie wleto do każdej butli ze żwirem i nasionami po 20 ml roztworu regulatorów wzrostu to jest kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>) w stężeniu 0,01 mg dm<sup>-3</sup>. Wypełnione butle trzymano w warunkach całkowitej ciemności, w temperaturze 7°C +/- 1°C i wstrząsano co 24 godziny w celu poddania nasion procesowi skaryfikacji. Następnie nasiona oczyszczono ze żwiru celem ich zaotoczkowania. Nasiona sosny zwyczajnej otoczkowano przy użyciu pokrywającego nasiona materiału mineralnego pylasto-ilastego o ziarnach nie większych niż 0,2 mm, który wcześniej został dodatkowo zmielony i do którego dodano wodny roztwór preparatu grzybobójczego (fungicydu) Sadoplon 75 WP o stężeniu substancji czynnej czyli tiuramu wynoszącej 750 g/kg w ilości 50g/ 1000 mL H<sub>2</sub>O. Jako spoiwa w procesie otoczkowania użyto wody. Aby

otrzymać kulisty kształt i dokładne pokrycie nasiona proces otoczkowania wykonano mechanicznie przy pomocy maszyny posiadającej bęben napędzany prądem elektrycznym zmiennym. Bęben urządzenia obracał się ze stałą prędkością, co umożliwiło dokładne pokrycie nasion substancjami otoczkującymi. Na koniec nasiona osuszono w temperaturze 21°C. Następnie nasiona poddano kiełkowaniu w kiełkownikach zaopatrzonych w oddzielne tace. Na tacach umieszczono wcześniej wysterylizowane w autoklawie w temp. 121°C przez 20 minut i schłodzone podłoże glebowe o pH 5,5, do którego wysiano nasiona sosny zwyczajnej. Kiełkowniki posiadały wbudowany system zraszaczy utrzymujący stałą wilgotność powietrza na poziomie 85%. Kiełkowniki umieszczono w specjalnej, wentylowanej obudowie podzielonej na dwie komory z wbudowanymi diodami elektroluminescencyjnymi - light-emitting diode (LED). Wykorzystano dwa rodzaje sztucznego światła i trzy długości tego światła: czerwono-niebieskie oraz białe – zamontowane w oddzielnych komorach. W obudowie wraz ze światłem oraz automatycznie zaprogramowanym fotoperiodem wynoszącym 12 godzin, umieszczono dwa kiełkowniki w każdej komorze po jednym. Temperaturę w pomieszczeniu ustalono na poziomie 22°C±1°C. Dodatkowo wyhodowane siewki sosny zwyczajnej poddano analizom fizjologicznym pomiaru fluorescencji chlorofilu celem zbadania wpływu czynników wywołujących stres jak np. promieniowanie świetlne na funkcję aparatu asymilacyjnego. Analizy te pozwalają zaobserwować skutki stresu u sadzonek sosny, które to skutki w późniejszym okresie mogłyby spowodować nieodwracalne zmiany u roślin jak np. redukcję chlorofilu. Ponadto wykonano ekstrakcję barwników fotosyntetycznych oraz ich rozdział. Analizę przeprowadzono w programie HPLC 1260 (offline): Data Analysis. Wyznaczono procentowy udział poszczególnych barwników w próbce. Po wykonaniu testu przeanalizowano ilości rodzajów barwników występujących w każdej z próbek. Wykonanie odczyt ilości chlorofilu a oraz chlorofilu b. Izolacja barwników roślinnych jest niezbędna do określenia wpływu zewnętrznych warunków kontrolowanych na ich ilość w każdej z siewek. Określenie ilości barwników roślinnych jest niezbędne do weryfikacji prawidłowości przebiegu procesu fotosyntezy w siewkach sosny zwyczajnej, a w finalnym efekcie do sprawdzenia prawidłowości funkcjonowania sadzonek sosny zwyczajnej pod kątem ich fizjologii.

Przeprowadzone wielokrotne próby wykazały, iż nasiona sosny zwyczajnej są fotoblastyczne (fotoblastia dodatnia) i głównie w świetle białym LED (fotoperiod 12 godzin) osiągnięto wysokie wyniki kiełkowania nasion, co przedstawiono w Tabeli 1. Światło białe ma pozytywny wpływ na morfogenezę nasion i tkanek roślinnych. Emitowanie przez diody światło jest niskiej temperatury, co nie powoduje uszkodzeń tkanek oraz fotostresu. Diody umożliwiają regulację długości fal świetlnych. Inne atuty to ich niewielkie wymiary, bardzo długi okres ich żywotności i energooszczędność.

Dlatego w warunkach zewnętrznych (naturalnych), światło widzialne jest optymalnym światłem do kiełkowania nasion sosny.

Zastosowanie światła LED czerwono-niebieskiego (dł. fali świetlnej spektrum czerwonego 600 -700 nm, spektrum niebieskiego 400–500 nm,) stymuluje zapoczątkowanie procesu kiełkowania nasion, w szczególności ułatwiając pęknięcie twardych łupin nasiennych podczas pierwszego etapu kiełkowania. Jednak głównie światło białe LED (dł. fali świetlnej 380 – 710 nm) jest niezbędne do całkowitej morfogenetycznej przemiany skielkowanych siewek w pełni wykształcone sadzonki.

Rodzaj i długość fali świetlnej mają istotny wpływ na fotosyntezę roślin. Największe ilości chlorofilu a oraz b posiadały sadzonki sosny, które skielkowały z nasion otoczkowanych w świetle barwy białej (średnio 97%). W porównaniu do morfogenezy siewek zachodzącej w świetle czerwono-niebieskiego, w którym średnia zawartość obu chlorofili była niższa i wyniosła 74% uznano, że światło czerwono-niebieskie może być wprowadzone tylko podczas pierwszego etapu kiełkowania tj. w fazie imbibicji.

Nasiona, które nie zostały poddane żadnym zabiegom stymulujących osiągnęły najniższe wartości frekwencji kiełkowania w każdym rodzaju długości fali światła co można porównać w Tabeli 1.

Tabela 1. Frekwencja kiełkowania nasion (%) otoczkowanych w zależności od rodzaju zabiegu przerywającego spoczynek nasion oraz światła LED

<b>Barwa (długość) światła LED</b>	<b>Kontrola bez zastosowania zabiegów (%)</b>	<b>Stratyfikacja i skaryfikacja (%)</b>	<b>Regulatory wzrostu (%)</b>	<b>Zabieg stratyfikacji, skaryfikacji oraz regulatory wzrostu (%)</b>
białe	2,00	6,00	9,66	31,33
czerwono-niebieskie	2,00	6,00	8,00	28,66