



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja ZORKO

**PREVERJANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA
ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij – 1. stopnja

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja ZORKO

**PREVERJANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA
ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN**

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij – 1. stopnja

**QUALITY CONTROL OF SEED MATERIAL OF MEDICINAL AND
AROMATIC PLANTS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2011

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala izr. prof. dr. Tomaža Bartola in za somentorico prof. dr. Deo Baričevič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: izr. prof. dr. Tomaž Bartol
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Dea Baričevič
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Ivan Kreft
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 26. sep. 2011

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Mateja Zorko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 633.8:631.53.011(043.2)
- KG zdravilne rastline / aromatične rastline / semenski material / testi kalivosti / testi kakovosti
- AV ZORKO, Mateja
- SA BARTOL, Tomaž (mentor)/BARIČEVIČ, Dea (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2011
- IN PREVERJANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA ZDRAVILNIH IN AROMATIČNIH RASTLIN
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij – 1. stopnja)
- OP VI, 22 str., 5 sl., 39 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Interes za pridelovanje zdravilnih in aromatičnih rastlin (ZAR) izvira iz potreb farmacevtske in drugih predelovalnih industrij po izenačeni kakovosti rastlinskih drog. Poleg tega gojenje ZAR zmanjšuje nekontrolirano nabiranje samoniklih rastlin in tako preprečuje izumiranje vrst in izginevanje njihovih naravnih rastišč. Da pridelovalci ZAR pridelajo izenačene in kakovostne rastlinske droge, potrebujejo za setev kakovostni semenski material, ki ga pridelajo semenarji. Seme je temelj rastlinske pridelave. Da ohranimo kakovost semenskega materiala, moramo seme shranjevati v optimalnih razmerah, kot to izvajajo genske banke. Da dobimo informacije o kakovosti semenskega materiala, je potrebno seme testirati na življenjsko sposobnost in vigor. Razumevanje življenjske sposobnosti semena je zelo pomembno za produkcijo zdravih semen in njihovo shranjevanje, medtem ko se vigor nanaša na zmožnost in moč semena, da uspešno kali ob predhodno odstranjeni dormanci in ustvari normalne sadike v poljskih razmerah in tako maksimira pridelek. Za določanje življenjske sposobnosti semena je test kalivosti še vedno glavni sprejeti kriterij. Zanesljiv nadomestek testa kalivosti je tetrazol test (TT), ki zagotavlja hitre ocene življenjske sposobnosti. Metode za določanje vigorja semena temeljijo na merjenju stopnje kalivosti, rasti sadik in vrednostnih testih, stres testih in raznih biokemičnih testih. Znanstvene članke smo poiskali z uporabo informacijskih sistemov CAB Abstracts, Web of Science in ScienceDirect.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 633.8:631.53.011(043.2)
- CX medicinal plants / aromatic plants / seed material / quality control
- AU ZORKO, Mateja
- AA BARTOL, Tomaž (supervisor)/BARIČEVIČ, Dea (co-supervisor)
- PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2011
- TI QUALITY CONTROL OF SEED UNITS OF THE MEDICINAL AND AROMATIC PLANTS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO VI, 22 p., 5 fig., 39 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The interest in the cultivation of medicinal and aromatic plants (MAP) stems from the need of pharmaceutical as well as other processing industries to obtain botanical drugs of uniform quality. Moreover, MAP cultivation reduces unregulated harvesting of wild plants and thus prevent the extinction of species and their natural habitats. In order to obtain botanical drugs of uniformly high quality, seed suppliers need to produce quality seed for sowing. The seed is the basis for plant production. To preserve seed quality, seed must be stored under optimal conditions, as in gene banks. In order to acquire information about the quality of the seed, the seed must be tested for its viability and vigour. Understanding seed viability is of high importance for the production of healthy seeds and their storage; vigour refers to the ability and potency of the seed to germinate after dormancy and to form normal seedlings under field conditions, maximizing yields. Germination tests remain the primary and standard method for estimation of seed viability. The tetrazolium test (TT), which provides quick viability assessments, however, is a reliable alternative. The methods for seed vigour evaluation are based on measurements of germination, growth of seedlings, quality tests, stress tests and various biochemical tests. The scientific articles were obtained through CAB Abstracts, Web of Science and ScienceDirect databases.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
SLOVARČEK	VI
1 UVOD	1
2 OPREDELITEV POJMOV	2
2.1 SEME	2
2.2 DORMANCA SEMENA	3
2.3 ŽIVLJENJSKA SPOSOBNOST SEMENA (VIABILNOST)	3
2.4 VIGOR SEMENA	3
2.5 KALITEV SEMENA	4
2.6 ŽIVLJENJSKA SPOSOBNOST IN KALIVOST V NASPROTJU Z VIGORJEM	4
3 VPLIVI ZUNANJIH DEJAVNIKOV NA KAKOVOST SEMENA	4
4 SHRANJEVANJE SEMEN	7
4.1 OHRANJANJE KAKOVOSTI SEMEN V GENSKIH BANKAH	8
4.2 TEMPERATURA IN VLAGA SHRANJEVANJA	8
5 UKREPI ZA PREKINITEV DORMANCE IN IZBOLJŠANJE KALITVE, ŽIVLJENJSKE SPOSOBNOSTI IN VIGORJA SEMENA	9
6 TESTI ZA OCENJEVANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA	12
6.1 ORGANIZACIJE ZA TESTIRANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA	12
6.2 TESTIRANJE ŽIVLJENJSKE SPOSOBNOSTI	13
6.2.1 Testiranje kalivosti	13
6.2.2 Tetrazol testiranje	15
6.2.3 Drugi biokemični testi	16
6.2.4 Test izrezanega zarodka	16
6.2.5 Meritve električne prevodnosti	17
6.3. TESTIRANJE VIGORJA	17
6.3.1 Rast sadik in vrednostni testi	18
6.3.2 Stres testi	18
6.3.3 Biokemični testi	18
7 SKLEPI	19
8 VIRI	19
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Semenski material različnih oblik in velikosti	2
Slika 2: Odstotek kalivosti semena (A), odstotek vznika (B) in odstotek preživelih sadik (C) vrste <i>Artemisia sieversiana</i>	5
Slika 3: Shranjevanje semen v steklenih posodah	8
Slika 4: Učinek dima in dimljene vode na kalitev semen in vigor sadik	11
Slika 5: Vitanija (<i>Withania somnifera</i> (L.) Dunal)	15

SLOVARČEK

ZAR	Zdravilne in aromatične rastline
ISTA	Mednarodna organizacija za testiranje semena
AOSA	Združenje uradnih analitikov semena
ATP	Adenin trifosfat
GA	Giberelinska kilina
GADA	Glutaminska kislina
IPGRI	The International Plant Genetic Resources Institute
TT	Tetrazol test

1 UVOD

Zdravilna moč rastlin je znana že dolgo, ljudje pa zavedno ali nezavedno uporabljamo njihove koristne sestavine za ohranjanje in povrnitev zdravja ter dobrega počutja. Sodobna znanost vse bolj upošteva zdravilne in aromatične rastline (ZAR), uporabljamo pa jih v farmacevtski, prehranski, kozmetični in drugih predelovalnih industrijah. Preveliko izkoriščanje samoniklih zdravilnih rastlin za potrebe predelave pa lahko privede do izginotja njihovih rastišč. Samonikle zdravilne rastline tudi nimajo izenačene vsebnosti učinkovin, in sicer zaradi izražene interakcije med genotipom rastlinske vrste in okoljem (tla, podnebje, nadmorska višina).

Intenzivno zbiranje podzemnih gomoljev zdravilne rastline *Dioscorea dregeana* Kunth, ogroža njeno naravno populacijo. Edina možna alternativa za izpopolnitev potreb in povpraševanja na formalnih in neformalnih zdravilnih trgih je gojenje (Kulkarni in sod., 2007).

Kontrolirana pridelava ZAR ima prednost pred nabiranjem samoniklih rastlin, saj pridelovalci za izenačenost kakovosti rastlinskih drog izberejo najboljše sortno seme in sadike. Žal pa tudi pridelovanje predstavlja določeno stopnjo tveganja pri pridobivanju kakovostnih, učinkovitih in neškodljivih surovin. Prisotnost ostankov kemičnih sredstev za varstvo rastlin, drugih fitofarmaceutskih sredstev, ostanki radioaktivnosti, prisotnost težkih kovin ali toksičnih spojin, kot so npr. pirolizidinski alkaloidi v tleh, zmanjšujejo kakovost pridelanih drog.

Street in sod. (2007) so izvedli študijo o učinku elementov v sledovih – bakra (Cu), cinka (Zn) in težkih kovin, kot so kadmij (Cd), svinec (Pb) in živo srebro (Hg) – na kalitev in razvoj sadik pri vrstah *Bowiea volubilis*, *Eucomis autumnalis* in *Merwillia natalensis*. Cu in Zn pri koncentraciji 1 mg/l pomembno ($p < 0,05$) znižata odstotek kalivosti *E. autumnalis*. Nizke koncentracije Cu in Zn negativno vplivata na korenine vseh treh vrst. Koncentracije Hg med 0,5 in 1 mg/l bistveno ($p < 0,05$) zmanjša odstotek kalivosti *B. volubilis* in *E. autumnalis*. Cd in Hg sta pri 2 mg/l pokazala škodljive vplive na rast korenin pri *B. volubilis*. Koncentracije 0,5 mg/l vseh preizkušenih težkih kovin so značilno ($p < 0,05$) zmanjšale dolžino korenin *M. natalensis*.

Najpomembnejši življenjski znak kakovosti semena, je življenjska sposobnost semena, kar je bil ključni dejavnik za preživetje starodavnih agrarnih civilizacij v svetu. Drugi najpomembnejši znak kvalitete semena je vigor. Nanaša se na zmožnost in moč semena, da uspešno kali in ustvari normalne sadike v različnih gojitvenih razmerah in tako omogoča visok pridelek. Ker talne razmere med rastjo niso vedno optimalne, pridelovalci potrebujejo semena z dobro kalivostjo in vigorjem. Skupni cilj semenarjev in pridelovalcev je proizvodnja in dostopnost visoko kakovostnega semenskega blaga za setev. Da bi bili testi za vrednotenje kakovosti semena uporabni v laboratoriju, morajo biti zanesljivi, števnji, hitri, enostavni, poceni in relevantni za poljske razmere.

Informacije smo pridobili na podlagi ustrezne iskalne sintakse v podatkovnih zbirkah s pojavnostjo iskalnega izraza, v poljih naslov, izvleček in predmetne oznake (ključne besede). V Google Učenjak (Google Scholar) smo iskali z iskalnim izrazom s poenostavljeno sintakso,

pojavnostjo iskalnega izraza kjerkoli v dokumentu, a le v dokumentih formata PDF, ki so bili dostopni v polnih besedilih. V Web of Science ter ScienceDirect smo iskali informacije za celotno obdobje, v Google Scholar/Učenjak za zadnja tri leta, v CAB Abstracts pa smo izbrali le najbolj relevantne članke za zadnji dve leti. Informacije o zdravilnih rastlinah so razkropljene v velikem številu informacijskih sistemov in podatkovnih zbirk (Bartol in Baričević, 2002).

2 OPREDELITEV POJMOV

2.1 SEME

Fenaroli (1969) je seme opredelil kot botanično razvojno stopnjo cvetnic, ki razširja rastlino v prostoru. Služi razmnoževanju in preživetju rastlinskih vrst, človeka in živali. Čeprav se življenje v semenu po žetvi skoraj zaustavi, se lahko po odmrtnju matične rastline po krajšem ali daljšem obdobju mirovanja ponovno nadaljuje, ko iz njega požene nova rastlina v razmerah, ugodnih za kalitev. Seme za setev mora imeti čim večjo sposobnost kalitve.

Po oploditvi se začne semenska zasnova razvijati v seme. Pri kritosemenkah se seme razvije v plodnici, pri golosemenkah pa na površini plodnih listov (Sinkovič, 2010). Seme višjih rastlin sestavljajo kalček (zarodek ali embrio), hranilno tkivo (endosperm) in semenska lupina (testa). Embrio je v svoji prvi razvojni fazi heterotrofen, zato potrebuje hranilne snovi za nadaljnji razvoj. Rezervne snovi so lahko shranjene bodisi v kličnih listih kalčka ali pa v endospermu (Kranjčič, 2001). Semenska lupina je ponavadi iz več celičnih plasti in je lahko zelo močna. Ščiti zarodek pred mehaničnimi poškodbami in preskrbi seme za dolgoročno shranjevanje. Lahko preprečuje kalitev, ki je odvisna od fizikalnih lastnosti semenske lupine in kemičnih lastnosti semena (Encyclopedia ..., 1994).



Slika 1: Semenski material različnih oblik in velikosti
(Compagnia ..., 2007)

Na kakovost semena vpliva (Baričevič, 2008):

- genetska čistota (podobnost matični rastlini);
- fizikalna čistota – čistota semena (odsotnost primesi, drugih vrst in plevelov);
- fiziološki status (ohranjanje sadilne vrednosti življenjske sposobnosti in življenjske moči semena, na kar vplivajo različni dejavniki);
- zdravstveni status (zdravo seme ne sme kazati znakov okužbe s patogeni ali prisotnosti insektov);
- druge lastnosti semen (vsebnost vlage, stopnja zrelosti, velikost semena, barva semena).

2.2 DORMANCA SEMENA

Nezmožnost semen, da bi kalila v razmerah, ki so primerne za kalitev in zahtevajo vodo, temperaturo in kisik, imenujemo dormanca. Ta preprečuje kalitev semena v letnem času, ki za rast in razvoj rastline ni primeren. Dormanca semena lahko poteka v semenski lupini ali v zarodku. Semenska lupina lahko kemično zavira kalivost tako, da zavira dostop vodi in menjavo plinov, mehanično zavira rast zarodka in deluje kot ovira za fotorepcijo (Basu, 1995). Ohranjajo jo fizikalne lastnosti semenske lupine in kemijske lastnosti samega semena ter fiziološke lastnosti zarodka ali kombinacije teh dejavnikov (Encyclopedia ..., 1994).

2.3 ŽIVLJENJSKA SPOSOBNOST SEMENA (VIABILNOST)

Lastnosti semena, ki mu omogoča, da vzkali v razmerah ugodnih za kalitev, pod pogojem, da je bila pred testom kalivosti odpravljena dormanca semena, pravimo življenjska sposobnost (viabilnost). Pri standardnem testu kalivosti ISTA, za določen semenski material, je odstotek kalivih semen kvantitativno merilo za življenjsko sposobnost vzorca/partije. Za globoko dormantna semena rastlinskih vrst, ki kažejo obarvanje pri tetrazol testu in s tem življenjsko sposobnost semena, se odstotek semen prav tako šteje za kvantitativni izračun. Merjenje življenjske sposobnosti je izredno pomembno za ugotovitev vrednosti semena za setev in za industrijske namene (Basu, 1995).

2.4 VIGOR SEMENA

Vigor semena po definiciji AOSA (1983, cit. po Dornbos, 1995) je: Vigor semena vsebuje tiste lastnosti semena, ki odločajo o potencialu za hiter in uniformiran vznik in razvoj normalnega kalčka, pod širokim spektrom poljskih razmer. Vigor se razlikuje od kalivosti v številnih pogledih. V nasprotju z definicijo tehnologov o kalivosti, se definicija vigorja nanaša na merjenje uniformiranega in hitrega vznika, zato se osredotoča na semena z močnejšo kalilno zmogljivostjo. Vigor se osredotoča tudi na potencial vznika in na poljske razmere, tako optimalne kot neoptimalne.

2.5 KALITEV SEMENA

Kalitev je definirana (ISTA, 1985, cit. po Hampton, 1995) kot vznik in razvoj tistih osnovnih struktur zarodka, ki pri konkretnem semenu nakazujejo zmožnost razvoja normalne rastline ob ugodnih razmerah.

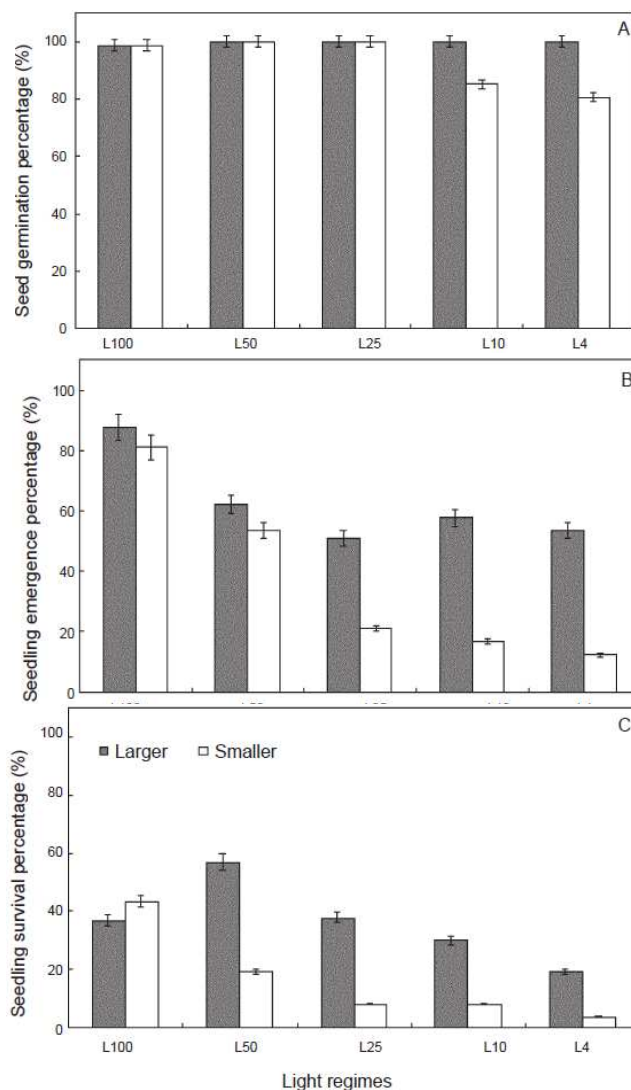
2.6 ŽIVLJENJSKA SPOSOBNOST IN KALIVOST V NASPROTJU Z VIGORJEM

Življenjska sposobnost (viabilnost), kalivost in vigor so izrazi za opis različnih vidikov kakovosti semenskega blaga. Ko jih začnemo povezovati med seboj, nam natančno opišejo kvaliteto semenskega blaga. Podatek za vigor brez podatka kalivosti ali obratno nam pove manj, kot če ju obravnavamo skupaj. Življenjska sposobnost in kalivost imata dvojni pomen. Smiselna uporaba pojma življenjska sposobnost je pogojena z razumevanjem, ki je odvisna od stroke, ki se ukvarja s semenom. Za semenske tehnologe se življenjska sposobnost semena nanaša na zmožnost semena, da vzkali in razvije normalen kalček. Iz fiziološkega vidika se življenjska sposobnost nanaša samo na to, da seme vsebuje tkiva, ki so metabolično aktivna, vsebujejo rezervno energijo in encime, ki so zmožni vzdrževati žive rastlinske celice. Isto seme tako lahko rastlinski fiziologi pojmujejo kot življenjsko sposobno, saj vsebuje živo tkivo, tehnologi pa ga pojmujejo nesposobno za življenje, zaradi nezmožnosti razvoja zdravega kalčka (Dornbos, 1995).

3 VPLIVI ZUNANJIH DEJAVNIKOV NA KAKOVOST SEMENA

Razlike v kakovosti semen iste rastlinske vrste se pojavljajo med leti in v istem letu, med agroklimatskimi rajoni in sosednjimi parcelami. Dejavniki, ki vplivajo na kakovost semena, so kakovost semena pred setvijo (dobro razvito seme prve generacije lahko razvije kakovostno seme druge generacije), rodovitnost tal, prehrana rastlin (vpliva preko rasti in razvoja rastline), temperatura in osvetljenost (vpliv na fotoperiodizem med dozorevanjem matične rastline, razvoj in dozorevanje semen in na dormanco) ter vlažnost tal. Močna suša med cvetenjem vpliva na slabšo oploditev po opraitvi, posledično je količina semen manjša. Suša med razvojem in dozorevanjem semen zmanjšuje maso in velikost semena, neugodni pa so tudi presežki vode v času dozorevanja. Predvsem nalivi pred žetvijo pa tudi uporaba herbicidov in pesticidov, povzročijo veliko škodo kakovosti semen (Basu, 1995).

Kalivost semen, vznik in preživetje sadik so preizkušali pri vrsti *Artemisia sieversiana* Willd. (Wu in sod., 2010). Študija je pokazala, da večja semena predstavljajo bistveno prednost v kalivosti, pri vzniku in preživetju vrste (tam, kjer se pojavi medsebojen vpliv teh dveh dejavnikov) v primerjavi z manjšimi semeni. Isti raziskovalci so preizkušali kalivost semen v razmerah različne osvetlitve, še posebej v senci. Rezultati raziskave so pokazali, da sadike, ki so se razvile iz večjih semen, izkazujejo večjo stopnjo preživetja, kot sadike, ki so nastale iz manjših semen znotraj vrste.



Slika 2: Odstotek kalivosti semena (A), odstotek vznika (B) in odstotek preživelih sadik (C) vrste *Artemisia sieversiana*, glede na velikost semena in različne svetlobne režime / Light regimes (L 100 = 100 % sončna svetloba, L 50 = 50 % sončna svetloba, L 25 = 25 % sončna svetloba, L 10 = 10 % sončna svetloba, L 4 = 4 % sončna svetloba) Larger = večja semena; Smaller = manjša semena (Wu in sod., 2010)

Razvoj semena poteka skozi celotno rastno sezono rastline. Po naravi je razvoj rastline sprva vegetativen, sčasoma pa postane reproduktiven. Vegetativna rast praktično nima neposrednega učinka na kakovost semena, ker celične strukture semena še niso razvite. Zdravje rastline med reproduktivno rastjo močno vpliva na kakovost semena. Med zgodnjim razvojem semena, po oprašitvi in oploditvi cvetov, se semenske celice intenzivno delijo in diferencirajo. Do izgube kakovosti semen lahko pride v primeru nenormalnih razmer v času celične delitve (Dornbos, 1995). Zunanji vplivi (sušni stres, stres zaradi patogenov ...), ki inhibirajo rast rastlin v fazi zasnove semen, lahko močno reducirajo vigor semena (Baričević in sod., 1998).

Bannayan in sod. (2008) so izvedli poskus, kako različni postopki namakanja vplivajo na pridelek in kakovost semena pri indijskem trpotcu (*Plantago ovata* Forsk.) in navadni črniki (*Nigella sativa* L.). Študija je pokazala, da je začetek cvetenja najbolj občutljivejša faza za

namakanje. To je obdobje med vegetativno in reproduktivno rastjo, ko se določa potencial števila cvetov na rastlino.

Življenjsko sposobnost in prisotnost živih tkiv v semenu ugotavljajo pred določanjem vigorja. Biokemične strukture, kot so mitohondriji, Golgijev aparat, DNA, RNA in različni metabolični proteini, so pomembni za intenzivno celično aktivnost na lokalni ravni in na koncu za kalilno sposobnost na makro ravni. Dogodki, ki zavirajo rast rastline med polnjenjem semena, lahko bistveno zmanjšajo nadaljnji vigor semena. Med polnjenjem semena se več založnih spojin, kot so proteini, lipidi in ogljikovi hidrati, hitro deponira kot energetske rezerve za eventualni proces kalitve. Med fazo polnjenja semena na kakovost semen močno vplivajo morebitne stresne razmere. Okoljski in patološki dogodki med razvojem semena, še posebej hitro polnjenje semena, pomembno vplivajo na semenski vigor (Dornbos, 1995).

Vpliv tipa tal na kalivost sta preiskovala El-Dorier in Youssef (2000). V peščenih tleh je bila stopnja kalivosti pri vrtni kreši (*Lepidium sativum* L.) največja in sicer 69,9 %. V glinenih tleh se je zmanjšala na 42 %, v ilovnatih tleh pa 19 %, najmanjša.

Z nastopom staranja matične rastline, ko zamre prehod med materinskim in semenskim tkivom, seme prestopi v fazo razvoja, imenovano fiziološka zrelost, ki je definirana z maksimalno suho maso semena. Ker je vigor maksimalen ob fiziološki zrelosti semena, je zaželeno, da žanjemo čimprej po zrelosti, vendar moramo v praksi počakati, da je seme dovolj suho, da preprečimo mehanske poškodbe. V času zorenja med fiziološko in žetveno zrelostjo je seme le še fizično odvisno od matične rastline (Dornbos, 1995).

Razmere, ki prevladujejo med žetvijo, način žetve in dodelava semena vplivajo na njegovo kakovost pred in po shranjevanju. Žetveni in obdelovalni postopki, opravljeni ročno ali strojno, vplivajo na življenjsko sposobnost semena. Mehanske poškodbe med žetvijo so lahko glavni vzrok za slabo kalitev pred in po shranjevanju. Medtem ko so večje poškodbe semen pri kalivosti vidne takoj, se manj opazne poškodbe semena povečajo pri shranjevanju in rezultat je viden v občutnem zmanjšanju življenjske sposobnosti in vigorja shranjenih semen. Obseg škode je odvisen od tipa semen, oblike in velikosti, debeline semenske lupine, strukture in položaja zarodka in zunanjih dejavnikov, kot je npr. vlaga. Večja semena so bolj izpostavljena poškodbam kot manjša. Splošna izkušnja je, da zelo suha semena utrpijo razpoke, medtem ko zelo vlažna semena potemniijo. Čvrsta semenska lupina pomeni prednost za varovanje pred mehanskimi poškodbami (Basu, 1995).

Čeprav so rezultati raziskav o vlogi velikosti semena pogosto kontradiktorni, lahko na podlagi izkušenj preliminarно določimo kakovost semena z vizualnim ocenjevanjem velikosti in izgleda ali specifične teže semena. V primerjavi z debelimi in značilnimi rjastorjavimi semeni sabljastega triplata (*Trigonella foenum graecum* L.) je kalivost drobnih in umazanih sivorjavih semen bistveno zmanjšana. Pri ahenah artičoke (*Cynara scolymus* L.) so te fertile, če se potopijo v vodi (Baričević in sod., 1998).

Če je seme med zorenjem izpostavljeno temperaturnim spremembam in spremembam v vlagi, je nagnjeno k izgubi vigorja. Poleg izgube vigorja pa se v času med fiziološko in žetveno

zrelostjo zgodijo še spremembe v višini sladkorja in olj. Vigor lahko ogrožajo motnje biokemičnih in fizioloških procesov (Dornbos, 1995).

Madžarski raziskovalci poročajo o svojih izkušnjah v zvezi s kalivostjo semen, požetih v različnih stopnjah zrelosti (nezrelo, polzrelo, zrelo) v okviru razvoja tehnologij genske banke za zdravilne rastline. Stopnja zrelosti semen močno vpliva na hitrost in odstotek kalivosti. Pri preizkušanju kalivosti po standardnih testih (ISTA, AOSA) so bile pri zrelih plodovih navadnega komarčka (*Foeniculum vulgare* L.) posamezne faze kalitve za 2–3 dni zgodnejše, kot pri manj zrelih plodovih. Plodovi sladkega komarčka (*Foeniculum vulgare* L.) in navadne kumine (*Carum carvi* L.), požeti v času voščene zrelosti, so izkazovali značilno povečanje (30 %) stopnje kalivosti med 6–12 mesečnim shranjevanjem. Podobne rezultate so dobili pri preizkušanju kalivosti nezrelih, polzrelih in fiziološko zrelih semen, ki vsebujejo maščobna olja, kot so kardobenedikta (*Cnicus benedictus* L.) in boraga (*Borago officinalis* L.), ki so odstotek kalivosti podvojila v času trimesečnega shranjevanja. Tudi pri kristavcu (*Datura stramonium* L.) so polzrela semena močno povečala kalivost po 12-mesečnem shranjevanju. Pri nobeni od proučevanih vrst v času žetve nezadostno zrelo seme ni doseglo stopnje kalivosti fiziološko zrelega semena (Baričević in sod., 1998).

Skoraj ni razlike v fizičnem videzu živih in neživih semen, razen tega, da je včasih izguba življenjske sposobnosti povezana z razbarvanjem semenske lupine. Fizična škoda se lahko zgodi v času padavin, žetve in prenašanja ali pri shranjevanju semena. Večja semena so bolj občutljiva za fizične poškodbe. Če je seme preveč suho, lahko poka, če pa je preveč mokro, lahko potemni. Veliko dokazov podpira hipotezo, da je poškodba semenske lupine odločilni fiziološki faktor izgube vigorja. Seme se lahko okuži z bakterijami, glivicami in virusi na polju ali pri shranjevanju, zmanjšanje vigorja pa je vidno skozi encimsko degradacijo, produkcijo toksinov in regulacijo rasti (Basu, 1995).

4 SHRANJEVANJE SEMEN

Čeprav je bilo seme dobro požeto in obdelano, lahko napačne tehnike shranjevanja škodljivo vplivajo na vzdrževanje življenjske sposobnosti semena in vigorja. Za načrtovanje ustreznih sistemov za shranjevanje semen mora biti vpliv različnih dejavnikov, ki vplivajo na življenjsko sposobnost in vigor semena, dobro pojasnjen.

Glede na vsebnost vlage med shranjevanjem semena in s tem povezano ohranitvijo življenjske sposobnosti v grobem ločimo dve skupini semen: ortodoksna (osušljiva) in rekalcitrantna (neosušljiva). Ortodoksna semena so tista, pri katerih se življenjska sposobnost po žetvi podaljšuje s postopnim zmanjševanjem vlage pred shranjevanjem, rekalcitrantna semena pa so tista, ki jih ne smemo osušiti pod kritično stopnjo vlažnosti, če želimo ohraniti viabilnost. Večina semen rastlinskih vrst zmernega pasu sodi v ortodoksno skupino (Basu, 1995).

Na splošno kažejo vrste družin Chenopodiaceae, Combretaceae, Compositae, Labiatae, Solanaceae in Pinaceae ortodoksno vedenje pri shranjevanju semena, medtem ko so semena vrst družine Rhizophoraceae rekalcitrantna (Hong in Ellis, 1996).

Dolgoživost suho shranjenih ortodoksnih semen je odvisna od vlage, temperature in prisotnosti kisika. Če zmanjšamo vlago in temperaturo ter zamenjamo kisik z inertnimi plini v hermetičnih kontejnerjih, omogočimo boljšo kalivost semen (Basu, 1995).

4.1 OHRANJANJE KAKOVOSTI SEMEN V GENSKIH BANKAH

Pri genskih bankah gre za ohranjanje genskih virov *ex-situ*, kar je nujni dodatni ukrep pri redkih in ogroženih vrstah, kjer v naravnem življenjskem habitatu ni možno ohranjanje *in-situ* (Strategija ..., 2002).

Najbolj primerna, varna in ekonomična metoda za ohranjanje osušljivih semen *ex-situ* je hladno shranjevanje. V optimalnih razmerah lahko življenjska sposobnost semena številnih vrst vzdrži več sto let. Najpomembnejša dejavnika pri shranjevanju semen v genskih bankah, sta odstotek vlažnosti in temperatura shranjevanja (Encyclopedia ..., 1994). IPGRI je objavil standarde za genske banke in priporoča sušenje semenskega materiala do 5 % vlage in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ za dolgoročno shranjevanje in srednjeročno do 8 % vlage in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Report ..., 2009).

Šentjanževka (*Hypericum perforatum* L.) je zdravilna rastlina z dokazano učinkovitostjo kot antidepresiv. Cilj študije je bil povečati poznavanje vedenja kalivosti semen šentjanževke s študijo 68-ih divjih populacij (Perez Garcia in sod., 2006).

Posode za hranjenje vzorcev semen v hladnem, morajo biti zatesnjene, vlažno neprepustne in zmožne prenesti shranjevanje za dolgo obdobje. Posebej so učinkovite steklene posode in kovinske pločevinke (Encyclopedia ..., 1994).



Slika 3: Shranjevanje semen v steklenih posodah
(Inhabitat ..., 2008)

4.2 TEMPERATURA IN VLAGA SHRANJEVANJA

Ker je vlaga semena zelo pomembna za ohranjanje življenjske sposobnosti, so semenski tehnologi in inženirji agronomije posvetili veliko pozornosti raziskavam sušenja semen.

Komercialno sušenje semena je visoko specializiran postopek, pri čemer ni pomembna samo končna vlažnost v semenu, temveč tudi začetna vlažnost, temperatura sušenja, stopnja in hitrost sušenja. Dvig temperature poveča stopnjo kemičnih in biokemičnih reakcij. V shranjenem osušljivem (ortodoksni) semenu je podaljšana faza dormance, v kateri bi morale biti encimsko katalitično-metabolne reakcije zelo omejene. Dvig temperature vpliva na dormanco semena. Ob zelo visokih temperaturah preko normalnega fiziološkega območja se zaradi nezmožnosti tolerance semena za premajhno vlažnost in visoko temperaturo sproži inaktivacija encimov in razgradnja struktur bioorganelov. Neencimski razkrajajoči procesi, kot je lipidna avtooksidacija, so bolj prisotni pri višjih temperaturah, ki pa skupaj z oddajanjem toplote avtooksidativnih produktov zmanjšajo življenjsko sposobnost (Basu, 1995).

5 UKREPI ZA PREKINITEV DORMANCE IN IZBOLJŠANJE KALITVE, ŽIVLJENJSKE SPOSOBNOSTI IN VIGORJA SEMENA

Močna semenska lupina se lahko omehča s toplo vodo, ognjem, koncentrirano kislino in zarezovanjem lupine. Dormanca, ki jo povzročajo kemični zaviralci v semenu, se lahko prekine z vlago in hladnim tretiranjem semena. Postopki stratifikacije so podobni naravnemu delovanju: poleti ali jeseni dozorela semena preko hladne zime mirujejo in kalijo naslednjo pomlad. Običajno se v postopku stratifikacije semena mešajo z materialom, kot je npr. šota, pesek, vermikulit ali perlit, zato da ostanejo vlažna in ustrezno zračna. Zmes semena in materiala se shranjuje v plastične vrečke in se ohranja pri temperaturi med 0 °C in 10 °C, odvisno od vrste, za različno dolga obdobja (običajno 4–10 tednov). V tem obdobju stratifikacije semena dozorevajo, v zarodku pa potekajo fiziološke spremembe in omogočajo kalivost, ki se pojavi ob dvigu temperature. Spiranje z vodo je eden izmed postopkov, ki se uporabljajo za prekinitev dormance, ki jo povzročajo kemijski zaviralci v semenski lupini. Spiranje semena je mogoče izvesti na dva različna načina: 12-urno namakanje semena v vodi (vodo je potrebno zamenjati na vsakih 12 ur) in pranje semena pod tekočo vodo za dan do dva (Encyclopedia ..., 1994).

Kalivost so preiskovali pri vzorcih semen škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), razvrščenih glede na vir semena. Eno skupino je sestavljajo sedem partij komercialno gojenih populacij, v drugi skupini pa je bilo devet serij regeneriranih iz *ex-situ* ohranjenih divjih populacij. Študije kažejo, da ponavljajoči se cikli setve semen med pridelavo zmanjšajo dormanco semen pri ameriškem slamniku. Nedormantnost semena ameriškega slamnika so našli v petih partijah iz komercialno gojenih virov. Ponavljajoči cikli regeneracije semen bi tako lahko zmanjšali ali celo preprečili dormanco v semenih ameriškega slamnika, kot je bilo to dokazano na primerih udomačitve mnogih drugih rastlinskih vrst. Metode, ki so jih uporabili za prekinitev dormance semen v ameriškem slamniku, so hladno-vlažna stratifikacija, osmotska sprožilnost in rastno-regulatorna obdelava (Qu in sod., 2005).

Rastni regulator, giberelinska kislina (GA₃), se lahko uporablja kot nadomestilo postopkov stratifikacije za veliko semen. Za GA₃ se je izkazalo, da premaguje notranjo fiziološko dormanco in spodbudi kalitev semen z dormantnimi zarodki (Encyclopedia ..., 1994).

Dormanco in zahteve za kalitev so preiskovali tudi v semenih vrste *Ferula gummosa* Boiss in v istrskem vredniku (*Teucrium polium* L.). Semena obeh vrst so bila podvržena različnim obdelavam, vključno z različnimi ravnmi GA₃, kislo stratifikacijo (HNO₃, H₂SO₄), hlajenjem in namakanjem v vodi pri različnih temperaturah. Giberelinska kislina (GA₃) je eden izmed hormonov, primernih za kontrolo primarne dormance in omogoča kalitev. GA₃ se pogosto uporablja za prekinitev dormance semen različnih semenskih vrst. Dormantna semena, ki zahtevajo hlajenje, suho shranjevanje po dozoritvi in svetlobo kot stimulator kalitve, so pogosto obdelana z GA₃, da prekinijo dormanco. Tudi nizke temperature imajo pomen pri zagotavljanju razmer za prekinitev dormance. Domnevajo, da je ob hkratnem učinkovanju nizkih temperatur tudi učinek GA₃ na prekinitev dormance večji oz. povečan. Spiranje semen z vodo in hlajenje v hladilniku sta standardna postopka pri ISTA, uporabljena za izboljšanje kalivosti dormantnih semen. Prav tako je odziv na kislo stratifikacijo močnejši v kombinaciji z GA₃ (Nadjafi in sod., 2006).

Vsi ti naštetih postopki prekinitve dormance posnemajo strategijo narave, naloga katere je preprečevanje prezgodnje kalitve v jeseni in pospešitev kalitve spomladi. Menjavanje/vrstenje zamrzovanja in odtaljevanja tal, prehod semen preko prebavnega trakta živali lahko postopno mehča trdo semensko lupino, obilno deževje spomladi izpira zaviralce kalitve, spreminjajoča se intenzivnost svetlobe in dolžine dneva lahko pospeši kalitev (Encyclopedia ..., 1994).

Bartuszevige in Gorchov (2006) sta raziskovala razširitev in razširjanje invazivnega semena maackovega kosteničevja (*Lonicera maackii*), azijskega grma v severovzhodni Ameriki. Ugotovila sta, da štiri domače in ena eksotična vrsta ptic uspešno razširjajo semena.

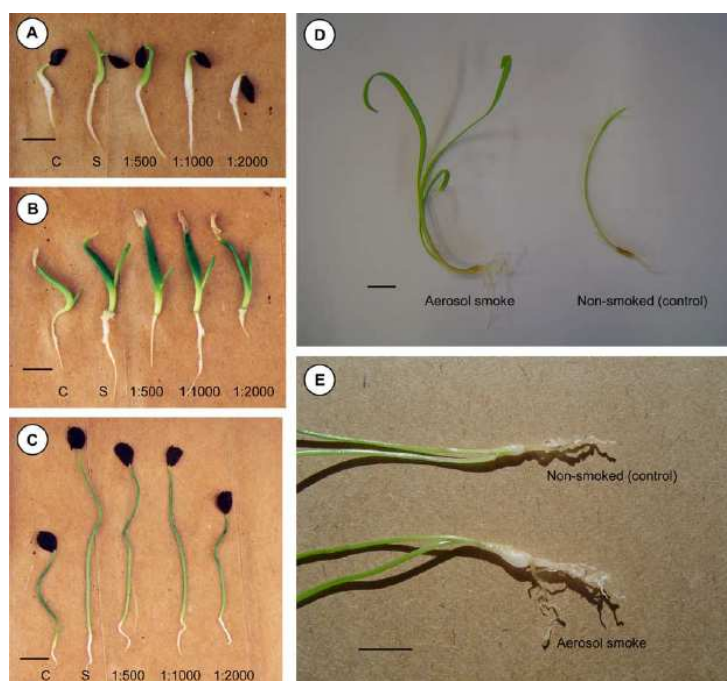
Čeprav je temperatura 5 °C pogosto optimalna pri hladni stratifikaciji, ki je potrebna za prekinitev dormance pri zdravih rastlinah zmernega pasu, so lahko tudi temperature v razponu med 0–10 °C učinkovite pri premagovanju dormance. Pri vrstah *Dioscorea japonica* in *Dioscorea septemloba*, je npr. prišlo do učinkovite prekinitve dormance pri 0 °C, pri 5 °C pa je bilo opaziti le malo ali nič kalivosti. Čeprav v tej študiji niso izrecno opazovali rast zarodka, so pri vrsti kosmati jam (*Dioscorea villosa* L.) ugotovili, da so zarodki, ki so bili izolirani iz semen in nato izpostavljeni višjim temperaturam (14–32 °C), vzklili v visokem odstotku (80 %), kar kaže, da so tople temperature spodbudile rast in razvoj zarodka. V naravi sveže seme premaga dormanco skozi zimo in semena začno hitro kaliti ob izpostavljenosti temperaturam toplih dni (15–20 °C) in hladnih noči (6–10 °C) (Albrecht in McCarthy, 2006).

Med dejavnike, ki pri posameznih rastlinskih vrstah izboljšajo življenjsko sposobnost semena, sodijo svetloba (okroglostna meta (*Mentha rotundifolia* L.)), GA₃ (rumeni svišč (*Gentiana lutea* L.)), prava sivka (*Lavandula angustifolia* Mill.), shranjevanje sveže požetih semen pri visoki relativni vlažnosti (navadna melisa - *Melissa officinalis* L.) oziroma pri nizki relativni vlažnosti zraka (mačja meta - *Nepeta cataria* L.). V nasprotju s tem, so sveža semena diploidnega in tetraploidnega kultivarja kamilice (*Chamomilla recutita* Rausch.), kalila pod 1 %, močno pa se kalivost poveča (80–100 %) s staranjem (hranjenja 200–300 dni, pri 10 °C in 30% relativni vlažnosti) (Baričević in sod., 1998).

Ekpong (2009) je raziskoval vpliv zrelosti semena, shranjevanja semena in predkalivostne obdelave na kalitev semen vrste *Cleome gynandra* L.. Največja suha masa semena (1,4 g) se je pojavila po 18. dnevu po dozorelosti cvetov. Shranjevanje zrelega semena pri 15 °C in pri

sobni temperaturi (30–33 °C) za pet mesecev, je pokazalo, da se dormanca v semenu prekine po treh mesecih v obeh temperaturnih režimih shranjevanja. Semena so pred kalivostjo obdelali z različnimi koncentracijami GA₃, KNO₃, spiranjem pod tekočo vodo, hlajenjem, namakanjem v vodi in ogrevanjem pri različnih temperaturah. Najuspešnejša obdelava za prekinitev dormance semena je bilo ogrevanje pri 40 °C, za obdobje enega do petih dni.

Uporaba dima in dimljene vode pospešuje kalitev semen in izboljša vigor sadik številnih rastlinskih vrst. To so dokazali v študiji treh avtohtonih zdravilnih rastlin *Albuca pachyklamys*, *Merwillia natalensis* in tulbagija (*Tulbaghia violacea*). Indeks vigorja sedem dni starih sadik, vseh treh vrst, so preučevali z uporabo dima v različnih razredčitvah (1 : 500, 1 : 1000, 1 : 2000) v primerjavi s kontrolno obdelavo. Rezultati so bili vidni v povečanju čebulic, listne mase, višine sadik in odstotku preživetja. Ta preiskava je pokazala, da se z uporabo tehnologije dima proizvajajo semena z visokim vigorjem (Sparg in sod., 2005).



Slika 4: Učinek dima in dimljene vode na kalitev semen in vigor sadik
 (A) *Tulbaghia violacea*, (B) *Merwillia natalensis*, (C) *Albuca pachyklamys* (7 dni po kalitvi);
 (D) *Tulbaghia violacea* in (E) *Albuca pachyklamys* sadike (75 dni po kalitvi);
 C = kontola, S = dimna obdelava
 (Sparg in sod., 2005)

Kulkarni in sodelavci (2007) so testirali kalitev zdravilne rastline *Dioscorea dregeana* Kunth pri različnih temperaturnih režimih, svetlobnih razmerah in tehniki dima. Ugotovili so, da temperatura igra pomembno vlogo pri rasti gomoljev. Največja rast je bila opažena pri temperaturi 30/15 °C in 25 °C. Pri 10 °C ni bilo opaziti rasti. Pod stalnimi razmerami teme, se je povprečni čas kalivosti (MTG) zmanjšal. Tudi v tej študiji je dimljena voda izboljšala kalitev in vigor sadik. Priporočajo zmerno uporabo gnojil in pri 25°C enkrat tedensko zalivanje z dimljeno vodo za vzgojo zdravih sadik vrste *Dioscorea dregeana* Kunth sadik.

Dokazano je, da ogenj spodbudi kalitev semen v številnih ekosistemih, občutljivih za požare, predvsem v Sredozemlju, in sicer pri grmičastih vrstah in vrstah s trdo semensko lupino. Toplota ali kemične sestavine, ki jih oddajata zogleneli les in dim, povzročijo prekinitev dormance v tleh shranjenega semena devetih zelnatih rastlin. Semena so bila izpostavljena temperaturi med 50 in 110 °C (do 180 °C za dve vrsti), za dve minuti. Kalitev tretiranih semen so spremljali v kalilni komori. Toplotna obdelava ni pospeševala kalivosti pri preskušanih vrstah. Toleranca semen za ogrevanje je različna med vrstami. Najmanjša semena dveh zelišč in treh trav lahko kalijo pri temperaturi 110 °C ali celo višje (Overbeck in sod., 2006).

Bank in Young (2011) sta ugotovila, da produkti gorenja vegetacije lahko povečajo kalivost semen mnogih vrst in rastlinskih skupnosti, nagnjenih k požaru. Testirali so vpliv toplote pri vrsti *Artemisia tridentata* Nutt. Po 83-ih dneh rasti od tretiranja z dimom, so semena proizvedla bistveno večjo rastlinsko maso kot kontrolna obravnavanja. Dimno tretiranje nekaterih semen pred setvijo, je potencialno uporabno pri proizvodnji vitalnih sadik.

Nabiranje semen z visoko vsebnostjo vlage pri zdravilni rastlini vrste *Podophyllum hexandrum* v vzhodni Himalaji je lahko eden od razlogov za pomanjkanje dormance. Tako predlagajo shranjevanje vlažnih semen v pesku na 25 °C, in sicer kot postopek za zagotavljanje visoke kalivosti in produktivne rezultate v vzgoji sadik (Kharkwal in sod., 2008).

6 TESTI ZA OCENJEVANJE KAKOVOSTI SEMENSKEGA MATERIALA

Vsaka popolna ocena življenjske sposobnosti semena bi morala zajemati (Hampton, 1995):

- zmožnost, da seme razvije normalen kalček,
- pričakovan poljski vznik in enotnost vznika,
- potencialno skladiščenje.

Da dobimo te informacije, je potrebno testirati življenjsko sposobnost semena in tudi vigor.

6.1 ORGANIZACIJE ZA TESTIRANJE KAKOVOSTI SEMEN

Dve izmed organizacij, ki testirajo kakovost semenskega materiala, sta ISTA – International Seed Testing Association in AOSA – The Association of Official Seed Analysts. Naloga organizacije ISTA je razvoj, sprejemanje in publiciranje standardnih postopkov za jemanje vzorcev, preučevanje semen in širjenje enakih metod in postopkov ter organiziranje seminarjev, tečajev in specializacij za strokovnjake, ki delajo v laboratorijih. Pravila ISTA se upoštevajo v pooblaščenih laboratorijih po vsem svetu, nobeno seme brez tega certifikata pa ne sme v mednarodni promet (International ..., 2001). Tudi AOSA je organizacija ustanovljena s ciljem, da razvije zakonske podlage za rokovanje s semenom in na ta način omogoči enotnost postopkov in natančnost v metodah preizkušanja, rezultatih in poročilih. Zagotavljati mora, da so testne metode standardizirane med analitiki in laboratoriji (Hampton, 1995).

6.2 TESTIRANJE ŽIVLJENJSKE SPOSOBNOSTI

Viabilno seme je tisto, ki je živo in je zmožno razviti metabolične reakcije, potrebne za kalitev in rast rastline. Seme je lahko viabilno, vendar ne more kaliti, ker so lahko procesi kalitve blokirani zaradi fizikalnih ali kemičnih inhibitorjev, kot v primeru dormance. Kalitev se lahko začne šele takrat, ko so ti inhibitorji odstranjeni. Zatorej neviabilno seme tudi v optimalnih razmerah ne bo kalilo, tudi če je nedormantno. Neviabilno seme tudi v ugodnih razmerah ne bo kalilo, tudi če je odstranjena vsakršna dormanca. V semenarstvu je izraz viabilnost oz. neviabilnost semena odvisna od njegove zmožnosti kalitve in normalnega razvoja kalčka. Enačiti viabilnost s kalivostjo je lahko zavajajoče glede na definicijo kalivosti. Fiziološko gledano, lahko rečemo, da je seme kalilo, ko požene koreninico; v tem smislu je viabilnost kalitev brez prisotnosti dormance. Pri testiranju lahko seme kali (in je zatorej viabilno), vendar razvije kalček, ki je abnormalen (ISTA, 1985, cit. po Hampton, 1995; AOSA, 1988, cit. po Hampton, 1995), tako da v tem pomenu viabilnost ni izenačena s kalivostjo, ki je označena na certifikatu analize. Semenska pošiljka lahko vsebuje 98 % viabilnih semen, od tega kalivost znaša 75 %, ker je 23 % od teh rastlin razvitih abnormalno. V praksi je viabilnost semena enačena z zmožnostjo kalitve.

6.2.1 Testiranje kalivosti

Testni postopki zahtevajo (ISTA, 1985, cit. po Hampton, 1995):

- natančno kontrolo temperatur, prostor za izmenične temperature, kontrolo vlage in svetlobe, kar se lahko doseže z Jakobsovim aparatom, kalilnimi komorami in sobnimi kalilniki;
- uporabo primernih substratov (pesek, papir, in redkeje zemlja);
- prostore za prekinitvev dormance (hladilnike, nizko temperaturne komore ali sobe, ogrevane komore, kemikalije);
- usposobljene ljudi, ki so za to delo primerno izobraženi.

Kalilni testi morajo biti objektivni, hitri in poceni ter ponovljivi in razumljivi.

Vpliv svetlobe med rastjo in razvojem ZAR je opazen že v času kalitve. Večina rastlin je indiferentnih do svetlobe, torej kalijo tako na svetlobi kot v temi (koper (*Anethum graveolens* L.), hidrolat rimske kamilice (*Anthemis nobilis* L.), francoski pehtran (*Artemisia dracunculoides* L.), vrtni ognjič (*Calendula officinalis* L.), navadni komarček (*Foeniculum vulgare* Mill.), navadna melisa (*Melissa officinalis* L.). Nekatere rastline kalijo bolje v temi (repik (*Agrimonia eupatoria* L.), navadni slez (*Althaea officinalis* L.), prava sivka (*Lavandula angustifolia* L.), vinska rutica (*Ruta graveolens* L.), druge pa bolje na svetlobi (angelika arhangelika (*Angelica archangelica* L.), volčja češnja (*Atropa belladonna* L.), prava kamilica (*Chamomilla recutita* Rausch.), zdravilna špajka ali badrijan (*Valeriana officinalis* L.), navadni lučnik (*Verbascum phlomoides* L.) (Baričevič, 1996).

Oblikovanje optimalnih razmer za kalitev semen zdravilnih rastlin je bistveno za gojenje. Pri indijskem trpotcu (*Plantago ovata* L.) in žabjem koprcu (*Descurainia sophia* L.) so raziskovalci ugotovili, da je hlajenje na 4 °C za deset dni najbolj učinkovita obdelava za kalitev semen obeh vrst (Ali in sod., 2010).

Test kalivosti ni popolnoma objektivni, saj delno temelji na subjektivni oceni semen, ki so kalila. Analitik se mora odločiti, če je mlada rastlina normalna (ima normalen razvoj v odraslo rastlino) ali abnormalna (ne kaže potenciala za razvoj v normalno odraslo rastlino). Pravila ISTA navajajo priporočila za presojo abnormalnosti: 13 napak na glavni korenini, 12 napak na hipokotilu, epikotilu in mezokotilu, 14 napak kotiledona, 7 napak na kličnih listih, 4 napake na terminalnem brstu, 14 napak na koleoptili in prvih listih in 9 napak na celi mladi rastlini. Katerakoli od teh napak, sama ali v kombinaciji z drugimi, je lahko vzrok, da analitik oceni rastlino za abnormalno. Kljub subjektivnim ocenam, so mednarodna testiranja proizvedla generalno enake rezultate (Hampton, 1995).

V študiji o razmnoževanju navadne arnike (*Arnica montana L.*) so ugotovili, da je najbolj učinkovit postopek kalitve semena pri 22 °C pri izmenično dnevno/nočni osvetljenosti (Balabanova in sod., 2009).

Testi imajo pomanjkljivost, da so počasni, kar je odvisno tudi od rastlinske vrste in poznavanja vrste. Zato so kalilni testi po mednarodnih standardih dragi. Kljub pomanjkljivostim pa ostaja test kalivosti še vseeno glavni sprejeti kriterij za določanje življenjske sposobnosti semena, saj se letno v svetu opravi nekaj milijonov teh testov, seveda pa se moramo zavedati njegovih omejitev (Hampton, 1995).

Test kalivosti, predpisan po ISTA (1985, cit. po Hampton, 1995) in AOSA (1988, cit. po Hampton, 1995), ima številne omejitve in kritike:

- je osnova za trgovanje;
- ni še popolnoma izpopolnjen; substrat mora npr. vsebovati dovolj vlage, test pa ne pove, kakšna naj bo količina dodane vode;
- velja za subjektivno ocenjevanje kakovosti, če je ta definirana/zasnovana na normalnih sadikah, izločijo se abnormalne, slabe/šibke, pa se štejejo med vse ostale.

Kalilni poskus za semena vitanije (*Withania somnifera (L.) Dunal*) so opravili v 9-cm sterilni petrijevki, obloženi z dvema filter papirjema, navlaženima s sterilno destilirano vodo, za zagotovitev ustrezne vlage semen. Pri prvi obravnavi so bila semena izpostavljena stalni svetlobi, neprekinjeni temi in 16/8 ur dnevno/nočni osvetljenosti. Drugo obravnavanje je bila hladna obdelava na 4 °C za en dan, 3 in 7 dni. Pri tretjem obravnavanju so preizkušali učinek temperature na kalitev semen, ki so jih 43 dni inkubirali v komori pri stalni temperaturi 25 °C, 35 °C, 45 °C in pod izmenično dnevno nočno temperaturo 18–25 °C ter izmenično dnevno nočno svetlobo 16/8 ur, kot predpisuje AOSA. Inhibitorje kalivosti so ustavili tako, da so semena pred poskusom za pet dni namočili v destilirani vodi. Semena so površinsko sterilizirali v vodni raztopini 0,1 % živosrebrnega klorida za 60 sekund za preprečitev glivičnega obolenja in nato sprali s sterilno vodo. Semena so pregledovali vsak dan in ko je bila vidna koreninica, so menili, da je seme vzklilo (Kambizi in sod., 2006).

Kalilni testi nam povedo, kako naj shranjujemo semena, ki bodo uporabljena za setev, saj najboljše razmere ohranjajo kakovost semen, ne morejo pa je izboljšati. Začetna kakovost semena določa njegovo potencialno dolgoživost v vseh razmerah shranjevanja, kalilni test in vsebnost vlage v semenu se tradicionalno uporabljata za pridobitev podatkov, na katerih temeljijo odločitve o načinih shranjevanja. Tako bi lahko upravljalec skladišča pravilno sklepal, da se semena s kalivostjo 95 % lahko shranjujejo dalj časa v enakih razmerah temperature in vlage kot semena iste vrste in kulture s kalivostjo 75 %. Čeprav podatki o

kalivosti pred shranjevanjem ne ocenjujejo njegove semenske dolgoživosti, se lahko semena s podobno kalivostjo izrazito razlikujejo pri shranjevalni uspešnosti (Hampton, 1995).

Kulkarni in sod. (2007) so v študiji ugotavljali zahteve glede kalivosti semena, ki so pomembne za ohranjanje in razmnoževanje vrste *Eucomis autumnalis sub sp. autumnalis*, ki je ogrožena, a še pogosto uporabljena zdravilna rastlina v južni Afriki. V tej študiji so ugotavljali pogoje za povečanje kalivosti. Semena so bila izpostavljena različnim okoljskim dejavnikom, kot so stalna in izmenična temperatura, hlajenje, temperaturni premiki in svetlo/temne razmere. Učinki dimljene vode in novo odkrita dimljena voda (3-metil-2H-furo [2,3-c] piran-2-on) so bili testirani na kalitev. Pri 20 °C in izmenični temperaturi (30/15 °C), pod režimom 16/8 h svetloba/tema se je kalitev izboljšala.

6.2.2 Tetrazol testiranje

Hitre metode biokemičnega določanja življenjske sposobnosti semena so se začele razvijati v začetku prejšnjega stoletja. Lakon (1942, cit. po Hampton, 1995) je prvi poročal o uporabi tetrazolijeve soli za testiranje življenjske sposobnosti. Tetrazol test (TT) temelji na načelu, da se, ko brezbarven trifenil tetrazolijev klorid ali bromid vstopi v tkivo žive rastline, reducira na rdeč, stabilen in nedifuziven trifenil formazan. Do tega ne pride v mrtvih semenih, ki ostanejo neobarvana.

Kambizi in sod. (2006) so testirali življenjsko sposobnost semena vitanije (*Withania somnifera* (L.) Dunal), z uporabo tehnike tetrazol. Semena vitanije so bila namočena za 24 ur v vodi, nato so jih namočili v brezbarvno 0,1 % 2,3,5-trifeniltetrazol klorid raztopino za 16 ur pri 25 °C v temi. Semena so nato odstranili iz raztopine, sprali z destilirano vodo in jih namočili v 10-mililitrsko raztopino 95% etanola, da je bilo omogočeno neposredno opazovanje zarodkov. Zarodki vitalnih semen so postali rdečkaste barve.



Slika 5: Vitanija (*Withania somnifera* (L.) Dunal)
(Andhra ..., 2011)

Ogata in sod. (2008) so ugotavljali življenjsko sposobnost semena navadne konoplje (*Cannabis sativa* L.) z uporabo 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolijevega klorida (TTC). Endogeno

delovanje encimov v semenu konoplje je pretvorilo brezbarvni TTC v rdeč 1, 3, 5-trifenilformazan. Živi zarodki so se obarvali rdeče, medtem ko se zarodki mrtvih semen niso obarvali. Reakcija je bila aktivna v različnih območjih pH (8,0–9,0), optimalno aktivnost pa so ugotovili pri 40–50 °C. V optimalnih razmerah, jim je uspelo ugotoviti življenjsko sposobnost semena, na podlagi obarvanosti barve v 20-ih minutah. Metoda je hitra in preprosta ter uporabna kot alternativa testu kalivosti.

TT zagotavlja hitre ocene življenjske sposobnosti semena. Je splošno priznan in natančen test in velja kot primarna metoda testiranja kalivosti, ki določa življenjsko sposobnost dormantnih semen in diagnosticiranje. TT so kritizirali zaradi proceduralnih in interpretativnih težav, nezmožnosti za odkritje fitotoksičnosti, temperaturnih poškodb, glivičnih okužb ter dormance (Hampton, 1995). TT naj bi bil natančen, ponovljiv, interpretativen, hiter, objektiv in enostaven ter ekonomično praktičen. Kot vsak test ima tudi TT svoje omejitve. Če ga speljemo pravilno, je lahko:

- zanesljiv nadomestek testa kalivosti;
- priskrbi hitre informacije o življenjski sposobnosti dormantnih in nedormantnih semen;
- nakaže vzroke za slabšo kakovost semena v nasprotju s kalilnim testom.

6.2.3 Drugi biokemični testi

Številni drugi hitri biokemični testi življenjske sposobnosti so bili razviti pred ali ob istem času kot TT. Te metode so bile različno uspešne in jih je izpodrinila tetrazoljeva metoda. Eden izmed testov, ki so ga razvili najprej, je bil selenit test, ki je bil zasnovan na redukciji brezbarvne selenitske soli z dehidrogenazo živih celic v rdeč elementarni selenit. Poskusi so bili narejeni tudi z drugimi kemikalijami, kot so metilen moder, dinitro benzen, vendar nobeden ni tako praktičen kot tetrazoljeva sol (Hampton, 1995).

6.2.4 Test izrezanega zarodka

To metodo, ki vsebuje izrez zarodka in njegovo inkubacijo, v razmerah primernih za rast, je za določanje življenjske sposobnosti semen drevesnih vrst primarno razvil Flemion (1938, 1948, cit. po Hampton, 1995). Živi zarodki po obravnavi kažejo znake rasti, sposobnosti razvoja klorofila ter ostanejo čvrsti in sveži, medtem ko neživi zarodki kažejo znake razpada. Test ne razkrije poškodb korenin, okužb s plesnijo in mehanskih poškodb, čeprav se poškodovani zarodki ločijo od neživih po lokalizirani razbarvanosti tkiva po 24-ih urah inkubacije. Pomembna je visoka stopnja usposobljenosti za izrez zarodka, prav tako pa veliko časa. Dolce in sod. (2010) so za študijo kalivosti drevesnega semena mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – Hil.), ki spada v družino bodikovk (Aquifoliaceae), za regeneracijo rastlin razvili postopek kot alternativo pri *in vitro* zarodku kulture v aseptičnih razmerah. Učinek endosperma, olesenelega endokarpa in hladne obdelave na razvoj zarodka in kalivost so preučili s kulturo izoliranega zarodka semen. Rezultati, pridobljeni z *in vitro* kulturo, so pokazali višjo stopnjo kalivosti in vigorozne sadike. Kultura izoliranega zarodka, je krajša skozi tehniko zarodkove kulture in zmanjšuje poškodbe mladih zarodkov.

6.2.5 Meritve električne prevodnosti

Merjenje električne prevodnosti razsutih semen predstavlja osnovo testov prevodnosti za oceno semenske sposobnosti. Pri tem se uporabljajo standardni merilci prevodnosti in elektrode ali avtomatski elektronski analizator semen. Naprava ima sposobnost monitoringa vrednosti individualne semenske prevodnosti, katere rezultati se uporabljajo za napovedovanje življenjske sposobnosti semena, glede na izbrano vmesno vrednost, kar pomeni, da so semena nad to vrednostjo nekaljiva, pod njo pa kaljiva. Vmesne vrednosti se razlikujejo od vrste do vrste (Hampton, 1995).

6.3 TESTIRANJE VIGORJA

Vigor testi so pomembno dopolnilo k raziskavam na področju proizvodnje semena in njegove kakovosti. Semenski tehnologi in fiziologi skušajo definirati in razumeti spremenljivke, ki zmanjšujejo katerikoli vidik zmogljivosti semena, da bi se izognili izgubam vigorja med proizvodnim procesom. Vigor je sprejet kot pomemben del kakovosti semena. Tema o vigorju je zelo kompleksna, saj so v odboru ISTA Vigour Test Committee potrebovali 27 let, da so se zedinili o definiciji. Skozi programe sta Vigor Test Committees ISTA in AOSA sodelovala za rutinsko preverjanje različnih razmer za testiranje vigorja, a je napredek počasen. Za relativno malo vrst se uradni vigor testi redno opravljajo.

Cilji testiranja vigorja se razlikujejo, vendar obstaja nekaj osnovnih zahtev za ustreznost vigor testa (Hampton, 1995):

- da se zagotovi bolj občutljiv kriterij semenske kakovosti kot je kalilni test;
- da zagotovi konsistentno razvrstitev kategorij z izraženo potencialno zmogljivostjo semena;
- da je objektivni, hiter, enostaven in ekonomičen;
- da ga lahko ponovimo in interpretiramo.

Poznani so trije pristopi pri ocenjevanju vigorja semen:

- posamezni testi, ki temeljijo na različnih vidikih kalitve;

To je najbolj poznan pristop. Metode temeljijo na merjenju kalilne stopnje, na oceni rasti sadike, hladnem testu, testu pospešenega staranja in testu kontroliranega poslabšanja. Ta tip testov je enostaven in lahko velja za rutinski test v kontrolnih laboratorijih. Veliko obetata test pospešenega staranja in kontroliranega poslabšanja.

- poskusi razvijanja fizioloških in biokemičnih kazalcev vigorja;

Glede na napovedane omejitve in čas, potreben za večino kalilnih testov, so si v zadnjih 25-ih letih prizadevali, da bi uporabili fiziološke in biokemične lastnosti semena kot kriterij za vigor semena. Najbolj poznani od teh so test električne prevodnosti in tetrazol test. Drugi pristopi, ki jih pogosto uporabljajo, vključujejo merjenje kapacitete dihanja, vsebnost ATP-ja in glutaminske kisline (GADA), registrirani pri AOSA. Z izjemo testa prevodnosti, drugih metod iz te kategorije ne priporočajo.

- postopki večkratnega testiranja.

V prizadevanju za razvitje bolj natančnih kazalcev vigorja so številni raziskovalci razvili vigor teste, ki vključujejo ocene, ki temeljijo na več kot eni tehniki in/ali uporabljajo bolj različne interpretacije podatkov testiranja. Najbolj uspešen postopek večkratnega testiranja je

podaljšana metoda testa prevodnosti. Rezultate testov za oceno vigorja lahko interpretiramo kot relativno oceno, oblikovano na podlagi testiranja različnih semen ali pa kot absolutno vrednost vigorja.

Vigor testi so klasificirani kot testi za oceno rasti sadik, testi za vrednotenje odziva semena na stres ali kot biokemični testi. Podrobni postopki najbolj sprejetih testov so predstavljeni v *Priročniku za testiranje vigorja* (AOSA, 1983, cit. po Hampton, 1995).

6.3.1 Rast sadik in vrednostni testi

Rast sadik in vrednostni test vključuje klasifikacijo vigorja sadike, stopnjo rasti sadike in hitrost kalilnega testa. Od teh je test stopnje rasti sadike med najbolj sprejetimi zato ker suha masa sadike predstavlja logično in relevantno oceno hitrega in uniformnega vznika (kar je želja proizvajalcev semen), s tem pa se izognemo tudi bolj subjektivnim ocenam. Kritiki opozarjajo na nevarnost pristranskosti pri semenih večjih velikosti (Dornbos, 1995).

6.3.2 Stres testi

Stres testi vsebujejo postopke za pospešeno staranje, postopke hladnega testa in ozmotske teste. Od naštetih se hladni test zelo široko uporablja v semenarnah in testnih organizacijah (ISTA, AOSA). Obravnavanje semen v razmerah hladne in vlažne zemlje, ki vsebujejo naravno mikrofloro, omogoča napoved ocene vznikov, podobno kot v dejanskih razmerah, v katerih poteka kalitev (Dornbos, 1995).

Sedghi in sod. (2010) so preiskovali kalitev in rast sadik vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis* L.) in navadnega komarčka (*Foeniculum vulgare* Mill.) pod različnimi ravnmi stresa slanosti. Večjo stopnjo kalitve so opazili pri vrtnem ognjiču, saj je pokazal večjo odpornost na slanost kot navadni komarček.

6.3.3 Biokemični testi

Biokemični testi vključujejo tetrazol test (TT), prevodnostni test, dihalni test, test dekarboksilarne aktivnosti GADA in teste vsebnosti ATP. Od teh je bil TT sprejet najbolje, vendar se zdaj uporablja manj, saj je za testiranje vzorcev potrebno veliko časa. Biokemične teste vigorja proizvajalci semen in zveze testiranja uporabljajo redkeje, zato ker so za njih potrebna obsežna sredstva za opremo, usposabljanje in ocenjevanje vzorcev (Dornbos, 1995).

7 SKLEPI

Seme je temelj rastlinske pridelave, saj brez kakovostnega semenskega materiala ni visokih pridelkov. Razvoj in povečanje proizvodnje in trgovine z zdravilnimi in aromatičnimi rastlinami je privedlo do izboljšanja tehnologij za končno obdelavo in shranjevanje semena. Življenjska sposobnost, kalivost in vigor so izrazi za opis različnih vidikov kakovosti semenskega blaga. Če jih povežemo med seboj, nam natančno opišejo kakovost semenskega blaga. Podatek za vigor, brez podatka o kalivosti ali obratno, je manj smiseln kot če ju obravnavamo skupaj. Vigor je merilo enotnega in hitrega vznika ter označuje semena z močnejšo kalilno zmogljivostjo. Tudi življenjska sposobnost in kalivost imata dvojni pomen. Življenjska sposobnost semena je enačena z zmožnostjo kalitve, kalitev semena pa je dosežena, ko osnovne strukture sadik pokažejo, ali se je razvila normalna rastlina. Za proces kalitve je potrebno predhodno odstraniti inhibitorje kalitve, tako imenovano dormanco semena.

Da dobimo informacije o kakovosti semenskega materiala, je potrebno seme testirati na življenjsko sposobnost in vigor. Test kalivosti še vedno obstaja kot glavni in najširše sprejet kriterij za določanje življenjske sposobnosti semena. Zanesljiv nadomestek testa kalivosti je tetrazol test, ki zagotavlja hitre ocene življenjske sposobnosti semena. Metode za določanje vigorja semena temeljijo na merjenju stopnje kalivosti in rasti sadik in so poznane kot vrednostni testi, stres testi in razni biokemični testi.

Dokumenti o različnih vidikih zdravilnih rastlin so zbrani v različnih informacijskih sistemih. Celotna besedila člankov niso vedno dostopna, zato je za učinkoviti izbor najustreznejših virov potrebno dobro poznavanje metodike iskanja informacij.

8 VIRI

Albrecht M.A., McCarthy B. C. 2006. Seed germination and dormancy in the medicinal woodland herbs *Collinsonia canadensis* L. (Lamiaceae) and *Dioscorea villosa* L. (Dioscoreaceae). *Flora*, 201, 1: 24–31

Ali T., Hossein P., Asghar F., Salman Z., Chahooki Z., Ali M. 2010. The effect of different treatments on improving seed germination characteristics in medicinal species of *Descurainia sophia* and *Plantago ovata*. *African Journal of Biotechnology*, 9, 39: 6588–6593

Andhra pradesh forest department - silviculture of species - medicinal plant. 2011. <http://forest.ap.nic.in/silviculture%20of%20species/Medicinal%20Plants/26.jpg> (29. avgust 2011)

Balabanova V., Vitkova A., Tashev A. 2009. A study of seed propagation of *Arnica Montana* L. (Asteraceae). *Plant Science*, 46, 5: 398–401

- Bank R. R., Young J. A. 2011. Heated substrate and smoke: influence on seed emergence and plant growth. *Journal of Range Management*, 51, 5: 577–583
- Bannayan M., Nadjafi F., Azizi M., Tabrizi L., Rastgoo 2008. Yield and seed quality of *Plantago ovata* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. *Industrial Crops and Products*, 27, 1: 11–16
- Baričević D. 1996. Priročnik za ciklus predavanj Pridelovanje zdravilnih rastlin I. del. Ljubljana, samozaložba: 117 str.
- Baričević D. 2008. Značilnosti razmnoževanja ZAR. Ljubljana, Biotehniška fakulteta <http://edepot.wur.nl/19161> (14. september 2011)
- Baričević D., Zupančič A., Bartol T. 1998. Značilnosti razmnoževanja zdravilnih in aromatičnih rastlin. *Sjemenarstvo*, 15, 98: 3–4
- Bartol T., Baričević D. 2002. Bibliometric analysis of agricultural and biomedical bibliographic databases with regard to medicinal plants genera *Origanum* and *Lippia* in the period 1981-1998. V: *Oregano: The genera Origanum and Lippia. Medicinal and aromatic plants-industrial profiles*. Kintzios, S. E. (ed.). New York, Taylor and Francis, 25: 245–267
- Bartuszevige A.M., Gorchoy D. L. 2006. Avian seed dispersal of an invasive shrub. *Biological Invasions*, 8, 5: 1013–1022
- Basu R. N. 1995. Seed viability V: Seed quality. Basic mechanisms and agricultural implications. Basra A. S. (ed.). New York, Food Products Press: 1–34
- Compagnia del giardinaggio. 2007. <http://www.compagniadelgiardinaggio.it/albums/banca-delseme/bancadelseme2.jpg> (31. avgust 2011)
- Dolce N. R., Mroginski L. A., Rey H.Y. 2010. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. *Seed Science and Technology*, 38, 2: 441–448
- Dornbos D. L. 1995. Seed vigor V: Seed quality. Basic mechanisms and agricultural implications. Basra A. S. (ed.). New York, Food Products Press: 45–77
- Ekpong B. 2009. Effects of seed maturity, seed storage and pre-germination treatments on seed germination of cleome (*Cleome gynandra* L.). *Scientia Horticulturae*, 119, 3: 236–240
- El-Darier B., Youssef R. S. 2000. Effect of soil type, salinity, and allelochemicals on germination and seedling growth of a medicinal plant *Lepidium sativum* L. *Annals of Applied Biology*, 136: 273–279

- Encyclopedia of agricultural science, volume 3. 1994. San Diego, Academic Press: 665 str.
- Fenaroli L. 1969. The maize grain: its composition, marketing characteristics and conditions for safe storage. *Maydica*, 14: 96-106
- Hampton J. G. 1995. Methods of viability and vigor testing: a critical appraisal V: Seed quality. Basic mechanisms and agricultural implications. Basra A. S. (ed.). New York, Food Products Press: 81–112
- Hong T. D., Ellis R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome, Italy, International Plant Genetic Resources Institute: 64 str.
- Inhabitat design will save the world. 2008.
<http://www.inhabitat.com/wp-content/uploads/seed3.jpg> (31. avgust 2011)
- International rules for seed testing. Rules amendments 2001. 2001. Zurich, International Seed Testing Association: 333 str.
- Kambizi L., Adebola P.O., Afolayan A.J. 2006. Effects of temperature, pre-chilling and light on seed germination of *Withania somnifera*; a high value medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 72, 1: 11–14
- Kharkwal A. C., Kushwaha R., Prakash O., Ogra R. K., Bhattacharya A., Nagar P. K., Ahuja P. S. 2008. An efficient method of propagation of *Podophyllum hexandrum*: an endangered medicinal plant of the Western Himalayas under ex situ conditions. *Journal of Natural Medicines*, 62, 2: 211–216
- Krajnčič B. 2001. Botanika, Razvojna in funkcionalna morfologija z anatomijo. 3. izd. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 452 str.
- Kulkarni M. G., Street R.A., Van Staden J. 2007. Germination and seedling growth requirements for propagation of *Dioscorea dregeana* (Kunth) Dur. and Schinz – A tuberous medicinal plant. *South African Journal of Botany*, 73, 1: 131–137
- Nadjafi F., Bannayan M., Tabrizi L., Rastgoo M. 2006. Seed germination in dormancy breaking techniques for *Ferula gummosa* and *Teucrium polium*. *Journal of Arid Environments*, 64, 3: 542–547
- Ogata J., Kikura-Hanajiri R., Yoshimatsu K., Kiuchi F., Goda Y. 2008. Detection method for the ability of Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed germination by the use of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC). *The Pharmaceutical Society of Japan*, 128, 11: 1707–1711
- Overbeck G. E., Muller S. C., Pillar V. D., Pfadenhauer J. 2006. No heat-stimulated germination found in herbaceous species from burned subtropical grassland. *Plant Ecology*, 184, 2: 237–243

- Perez-Garcia F., Huertas M., Mora E., Pena B., Varela F., Gonzalez-Benito M. E. 2006. *Hypericum perforatum* L. seed germination: interpopulation variation and effect of light, temperature, presowing treatments and seed desiccation. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 6: 1187–1198
- Qu L., Wang X., Chen Y., Scalzo R., Widrlechner M.P., Davis J.M., Hancock J. F. 2005. Commercial seed lots exhibit reduced seed dormancy in comparison to wild seed lots of *Echinacea purpurea*. *HortScience*, 40, 6: 18431–845
- Report of a working group on medicinal and aromatic plants. Third meeting, 26–28 June 2007. 2009. Olomouc, Czech Republic, Bioersivity International: 19 str.
- Sedghi M., Nemati A., Esmailpour B. 2010. Effect of seed priming on germination and seedling growth of two medicinal plants under salinity. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 22, 2: 1301–39
- Sinkovič T. 2010. Uvod v botaniko. 2.izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 208 str.
- Sparg S. G., Kulkarni M. G., Light M. E., Van Staden J. 2005. Improving seedling vigour of indigenous medicinal plants with smoke. *Bioresource Technology*, 96, 12: 1323–1330
- Strategija ohranjanja biotske raznovrstnosti v Sloveniji. 2002. Ljubljana, Ministrstvo za okolje in prostor RS: 38 str.
- Street R. A., Kulkarni M. G., Stirk W. A., Southway C., Van Staden J. 2007. Toxicity of metal elements on germination and seedling growth of widely used medicinal plants belonging to Hyacinthaceae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 4: 371–376
- Wu G.W., Li W., Du G.Z. 2010. Effects of seed mass and light on seedling success in *Artemisia sieversiana* Willd. in the Tibetan plateau. *Polish Journal of Ecology*, 58, 3:469–474

ZAHVALA

Za strokovne nasvete, pomoč in razumevanje se zahvaljujem mentorju izd. prof. dr. Tomažu Bartol in somentorici prof. dr. Dei Baričevič.

Prav tako se za vsestransko pomoč in oporo v času študija zahvaljujem svoji družini.