



ENSCONET

Zalecenia i Protokoły

Banków Nasion

Wersja polska podręcznika:
ENSCONET Curation Protocols & Recommendations

Opracowano przez:
Royal Botanic Garden, Kew

Wersja: 15 czerwca 2009



ISBN: 978-84-692-5961-0

Citation: ENSCONET (2009) ENSCONET Zalecenia i protokoły banków nasion

Treść niniejszego dokumentu oparto na treści warsztatów ENSCONET-u

“Krytyczny przegląd procedur w bankach genów”

przeprowadzonych w

Wydział “Ecologia del Territorio”, Uniwersytet w Padwie,
Via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia, Włochy

22 - 26 Października 2007

Tłumaczyła: Katarzyna Łoskot

Dostępne również w wersjach językowych: angielskiej, francuskiej, niemieckiej, greckiej, węgierskiej, włoskiej i hiszpańskiej.



ENSCONET otrzymał fundusze z Szóstego Programu Ramowego Wspólnoty Europejskiej jako Działanie Zintegrowane, wdrażane jako Akcja Koordynowana. Tekst niniejszego opracowania jest jedynie odzwierciedleniem poglądów beneficjentów, a Wspólnota Europejska nie odpowiada za wykorzystanie zawartych w nim informacji.

PODZIĘKOWANIA INSTYTUCJOM ZRZESZONYM W ENSCONET

Akronimy używane w niniejszym dokumencie oznaczają następujące instytucje i adresy:

RBGK - Wydział Ochrony Nasion, Królewski ogród Botaniczny, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, West Sussex RH17 6TN, WIELKA BRYTANIA

NKUA - Instytut Botaniki, Wydział Biologii, Narodowy Kapodystriański Uniwersytet w Atenach, Panepistimiopolis, Ateny 15784, GRECJA

IB SAS - Instytut Botaniki, Słowacka Akademia Nauk, Dúbravská cesta 14, 845 23 Bratysława, SŁOWACJA

BZBG - Zoo i Ogród Botaniczny w Budapeszcie, skr. poczt. 469, Állatkerti körút 6-12, H-1146 Budapeszt, WĘGRY
MAICH - Śródziemnomorski Instytut Agronomiczny w Chanii, Alsyllion Agrokepon, P.O. Box 85, 73100 Chania (Kreta), GRECJA

JB Cordoba - IMGEMA – Ogród Botaniczny w Cordobie, Avda. de Linneo s/n, 14004 Córdoba, HISZPANIA

TCD - Ogród Botaniczny Trinity College, Palmerston Park, Dartry, Dublin 6, IRLANDIA

Jardin Canario - Ogród Botaniczny Viera y Clavijo del Cabildo de Gran Canaria, Apdo 14, 35017 Tafira Alta, Las Palmas de Gran Canaria, HISZPANIA

CYARI - Instytut Badawczy Agrokultury, P.O.Box 22016, 1516 Nikozja, CYPR

UPM - Departament Biologii Roślin, Wyższa Szkoła Techniczna Nauk Agronomicznych, Uniwersytet Politechniczny w Madrycie, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madryt, HISZPANIA

NBGB - Narodowy Belgijski Ogród Botaniczny, Domein van Bouchout, 1860 Meise, BELGIA

MNHN - Narodowe Muzeum Historii Naturalnej, Wydział Ogródów Botanicznych i Zoologicznych, Case postale 45, 57, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, FRANCJA

UNI-PAV-CFA - Uniwersytet w Pawii, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Via S. Epifanio, 14, 27100 Pawia, WŁOCHY

Ogród Botaniczny w Pizie - Wydział Biologii, Uniwersytet w Pizie, Via Luca Ghini 5, 56126 Pisa, WŁOCHY

JB Soller - Ogród Botaniczny w Sóller, Ctra. Palma-Port de Sóller Km 30,5, Apartat de Correus 44, 07100 Sóller, HISZPANIA

MTSN - Muzeum Trydenckie Nauk Przyrodniczych w Trento, Via Calepina 14, 38100 Trento, WŁOCHY

UVEG - Ogród Botaniczny Uniwersytetu w Walencji, C/ Quart, 80, 46008 Walencja, HISZPANIA

HBV - Wydział Biogeografii i Ogród Botaniczny, Uniwersytet Wiedeński, Rennweg 14, 1030 Wiedeń, AUSTRIA

BG-CBDC PAS - Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej Polskiej Akademii Nauk, Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa 76, POLSKA

FUB-BGBM - Ogród i Muzeum Botaniczne w Berlinie-Dahlem, Wolny Uniwersytet Berlin, Königin-Luise-Str. 6-8, 14191 Berlin, NIEMCY

HUBG - Ogród Botaniczny, skr. poczt. 44 (Jyrängöntie 2), 00014 Uniwersytet w Helsinkach, FINLANDIA

FUL - Ogród Botaniczny, Muzeum Politechniki, R. Escola Politécnica 58, 1269-102 Lizbona, PORTUGALIA

NHMOSLO - Ogród Botaniczny, Muzeum Historii Naturalnej, Uniwersytet w Oslo, skr. poczt. 1172, Blindern, 0318 Oslo, NORWEGIA

IB-BAS - Wydział Botaniki Stosowanej, Instytut Botaniki, Bułgarska Akademia Nauk, 23, Acad. G. Bonchev Str., 1113 Sofia, BULGARIA

AS-BOKU - Instytut Botaniki i Ogród Botaniczny, Wydział Biologii Zintegrowanej, Uniwersytet Zasobów Przyrodniczych i Nauk Stosowanych, Gregor-Mendel-Str. 33, 1180 Wiedeń, AUSTRIA

Luxembourg - Żywe kolekcje roślinne, Narodowe Muzeum Historii Naturalnej, 25 rue Munster, 2160 Luxemburg, LUXEMBURG

Geneva - Konserwatorium i Ogród Botaniczny Miasta Genewa, 1 chemin de l'Imperatrice, skr. poczt. 60, 1292 Chambésy/GE, SZWAJCARIA

FIT Nicosia - Uniwersytet Frederick, Cypr, Wydział Ochrony Przyrody, skr. poczt. 24729, 1303 Nikozja, CYPR

Inne instytucje, które dostarczyły cennych komentarzy:

Węgierska Akademia Nauk, Instytut Badawczy Gleboznawstwa i Chemii Rolniczej, Wydział Biologii Gleby, Herman Ottó út 15, H-1022 Budapeszt, WĘGRY

Światowy Fundusz Różnorodności Roślin Uprawnych, adres korespondencyjny FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rzym, WŁOCHY

SPIS TREŚCI

ENSCONET Standardy postępowania z kolekcją.....	i
Wstęp.....	1
Temat 1. Czyszczenie nasion.....	4
Temat 1a. Wyposażenie i typowe czynności.....	5
Temat 2. Suszenie nasion.....	10
Temat 2a. Heterogeniczność próbek i szybkość suszenia.....	10
Temat 2b. Obieg powietrza.....	11
Temat 2c. Monitoring suszenia.....	11
Temat 2d. Warunki wilgotnościowe i termiczne suszenia.....	12
Temat 2e. Wyposażenie do suszenia nasion.....	13
Temat 3. Monitoring wilgotności.....	15
Temat 3a. Pomiar wilgotności względnej równoważnej	15
Temat 3b. Wykorzystanie higrometrów do pomiaru wilgotności nasion....	17
Temat 4. Pakowanie.....	19
Temat 5. Przechowywanie długoterminowe: temperatura.....	21
Temat 5a. Temperatura przechowywania.....	21
Temat 5b. Wybór wyposażenia i urządzeń chłodzących.....	22
Temat 6. Podstawowe testy kiełkowania.....	25
Temat 7. Weryfikacja i okazy zielnikowe.....	29
Temat 8. Dane.....	30
Temat 9. Regeneracja nasion.....	31
Załącznik 1. Posumowanie typowych systemów rozmnażania roślin.....	37
Załącznik 2. Możliwy formularz danych dla kolekcji odtworzonych.	39
Temat 10. Dystrybucja nasion.....	41
Literatura.....	43

ENSCONET - ZALECENIA TRAKTOWANIA KOLEKCJI NASION

CZYSZCZENIE NASION

Szczegóły dostępne w *Temacie 1*.

- Najlepiej starannie oczyścić partię nasion aż do usunięcia wszystkich domieszanych części roślin. Czasem jednak kolekcje trzeba zamrozić w stanie, w jakim zostały dostarczone, odnotowując to w bazie danych.
- Nasiona gatunków dzikich są czyszczone ręcznie, z wykorzystaniem sprzętu mechanicznego, które należy starannie oczyszczać pomiędzy procesami na poszczególnych próbkach nasion.
- Personel musi być obeznany z tematyką morfologii nasion i owoców oraz metodyki interpretacji struktur pod mikroskopem.
- Czyszczenie nasion prowadzi się pod wyciągiem z filtrem kurzu lub w wydzielonym obszarze, na którym personel nosi maski przeciwko pyłowi (odpowiedniej jakości).
- Nasiona w trakcie czyszczenia należy kontrolować pod względem oznak uszkodzeń korzystając z mikroskopu stereoskopowego.
- Powstałe w trakcie czyszczenia odpady należy zniszczyć, najlepiej poprzez kontrolowane spalanie.
- Ocenę liczby nasion pustych w oczyszczonej partii nasion wykonuje się za pomocą próby krojenia lub metodą rentgenowską.

SUSZENIE I KONTROLA WILGOTNOŚCI

Szczegóły dostępne w *Tematach 2 i 3*.

- Dopóki nie ma nowych danych, zaleca się suszenie nasion do stanu równoważnego o wilgotności względnej równoważnej ok. 15 % (3.5 – 6.5 % zawartości wody, zależnie od zawartości tłuszczu w nasionach) w temperaturze 10-20 °C, o ile będą później umieszczone w temperaturach ujemnych. Silne suszenie do niższych poziomów wilgotności zaleca się wówczas, gdy nasiona będą przechowywane w temperaturach dodatnich. Nie zaleca się suszenia ciepłem lub w piecu.
- W miarę możliwości, nasiona lub owoce będące w innej fazie dojrzewania należy oddzielić do pod-próbek, które poddane będą suszeniu po osiągnięciu dojrzałości.
- Aby zmaksymalizować tempo suszenia, nasiona rozkłada się cienką warstwą i kieruje ponad nie powietrze.
- Aby dojrzałe, nierozwinięte w pełni nasiona i owoce dojrzały, należy przez 2-3 tygodnie umieścić je w otoczeniu w warunkach podobnych do warunków w miejscu zbioru.
- Należy stopniowo suszyć nasiona pozyskane z dojrzałych mięsistych owoców w warunkach środowiska (60-70 % RH, 20-25 °C, przez 1-2 tygodnie).
- Stosować wilgotność względną równoważną (eRH) do kontroli procesu suszenia, z wystrzeganiem się potencjalnych źródeł pomyłek. Można do tego celu zastosować higrometr, zapis danych lub żel krzemionkowy.
- Dla średnich i dużych banków nasion (od kilkuset do kilku tysięcy pozyskanych rocznie próbek) zaleca się budowę pokoju suchego, gdzie wilgotność względną równoważną można kontrolować sztucznie. W przypadku małych operacji, z małymi ilościami pozyskiwanych prób (mniej niż 100 rocznie), zaleca się suszenie z żel krzemionkowy lub szafy suszarnicze.
- Nasiona o wysokiej zawartości wody należy podsuszać najpierw w warunkach środowiska przez 2-3 dni, aby usunąć wolną wodę przed dalszym osuszaniem. Stosując żel krzemionkowy, wskaźnik objętości żelu do nasion 1:1 powinien umożliwić wysuszenie nasion do poziomu bezpiecznego. (<30 % eRH).

PAKOWANIE

Szczegóły dostępne w *Temacie 4*.

- W przypadku przechowywania długoterminowego zaleca się stosowanie pojemników szklanych z możliwością wielokrotnego otwierania z systemem kontroli przecieku wilgotności (jeśli niezbędny jest regularny dostęp do kolekcji) lub stałe zamkniętych pojemników szklanych (jeśli nasiona nie muszą być dostępne).
- Najlepiej pakować nasiona w warunkach kontrolowanej wilgotności otoczenia.
- Zaleca się umieszczanie w pojemnikach żel krzemionkowy w saszetkach będący wskaźnikiem wilgotności w celu kontroli szczelności i ochrony przed katabolitami. Wilgotność względną saszetek należy wyrównać do poziomu 15%.
- Okresowo sprawdzać i wymieniać zamknięcia pojemników.
- Stosować standardową procedurę kontroli szczelności z wykorzystaniem próbných partii pojemników.

PRZECHOWYWANIE

Szczegóły dostępne w *Temacie 5*.

- Przy konwencjonalnym przechowywaniu w temperaturach nie kriogenicznych, obniżanie temperatury poniżej -35 °C nie wpłynie korzystnie na żywotność nasion, a jedynie spowoduje dodatkowe koszty.
- Dla gatunków o krótkotrwałych nasionach typu orthodox, można zalecać kriokonserwację w temperaturze ciekłego azotu lub nieco wyższej.
- Wszystkie próbki muszą posiadać duplikat w innym banku.

KIEŁKOWANIE

Szczegóły dostępne w *Temacie 6*.

- Zaleca się przeprowadzanie próby kiełkowania na największej możliwej liczbie k, po osuszeniu i procesach technologicznych nasion i w miarę możliwości przed złożeniem w banku. Najlepiej przeprowadzić próby kiełkowania przed i po suszeniu, aby sprawdzić, czy suszenie wpłynęło na kiełkowanie. Jeśli liczba nasion jest ograniczona i można przeprowadzić tylko jedną wstępną ocenę, zaleca się wykonać ją w ciągu pierwszego miesiąca przechowywania.
- Procent kiełkowania to liczba nasion, które fizycznie mogą być zdolne do kiełkowania (całkowita liczba nasion – nasiona uszkodzone lub puste).
- Podczas gdy optimum wielkości próbki to 200 nasion, w większości przypadków wystarczą 2 powtórzenia po 50 lub 25 nasion.
- Aby zapobiec uszkodzeniom od imbibicji, nasiona przed próbą należy nawilżyć.
- Kiełkowanie to proces bardzo plastyczny, a wymagania gatunków, populacji, lat zbioru a nawet prób o różnym okresie przechowywania pod tym względem mogą być bardzo zróżnicowane. Należy korzystać z publikacji lub baz danych (Liu *et al.*, 2008: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>) Jeśli brak informacji (przynajmniej o gatunkach spokrewnionych), wskazówką jest ekologia i struktura nasion danego gatunku.

- Nasiona wielu gatunków dziko rosnących cechuje spoczynkowość. Zależnie od typu spoczynku należy zastosować odpowiednie techniki jego przełamania.
- Podłożem wysiewu może być agar, bibuła filtracyjna lub piasek. Przewaga agaru (zwykle 1 %) to: łatwiejsze utrzymanie; niskie narażenie na uszkodzenia przez imbibicję; utrzymanie stałego stężenia zastosowanych substancji chemicznych; lepsza widoczność białych kiełków; możliwość wyjmowania siewek w celu przesadzenia.
- Zawsze należy stosować wodę destylowaną lub zdejonizowaną.
- Nie należy dotykać nasion rozłożonych na substracie.
- W miarę możliwości podczas stratyfikacji należy unikać stałych temperatur. Nie stosować także stałego światła, gdyż może ono hamować kiełkowanie.
- Na potrzeby testów kiełkowania można przyjąć, że nasiono skielkowane charakteryzuje się wykształceniem kiełka o długości 1-2 mm lub kiełkiem o długości co najmniej równej długości nasiona.

WERYFIKACJA I OKAZY ZIELNIKOWE

Szczegóły dostępne w *Temacie 7*.

- Poza nielicznymi przypadkami dobrze rozpoznanych populacji, należy zebrać sprasowane okazy roślin reprezentujące populację, z której pobrano nasiona. Należy zebrać okaz ostrożnie w przypadku populacji rzadkich lub zagrożonych.

DANE

Szczegóły dostępne w *Temacie 8*.

- Zbierając dane o kolekcjach nasion należy pamiętać, że powinny one być przydatne dla potencjalnych użytkowników zarówno obecnie, jak i przez cały okres istnienia kolekcji (być może przez ok. 200 lat). Dane muszą więc być obiektywne.

REGENERATION

Szczegóły dostępne w *Temacie 9*.

- Odtwarzanie kolekcji to kosztowny zabieg, trudny do poprawnego przeprowadzenia i najlepiej nie doprowadzać do konieczności jego przeprowadzenia zbierając duże kolekcje nasion wysokiej jakości. Czasem lepiej wykonać ponowny zbiór w naturze (o ile jest to nadal możliwe) niż odtwarzać nasiona.
- Personel banku nasion powinien dążyć do wszelkich starań w celu minimalizacji ryzyka selekcji, dryfu genetycznego lub hybrydyzacji z materiałem blisko spokrewnionym, pomimo iż trzeba mieć świadomość, że zjawisk tych nie da się w pełni uniknąć. Należy stosować posiadaną wiedzę dotyczącą systemu rozmnażania gatunku do wyboru metody odtwarzania (np. w przypadku gatunków o kojarzeniu niekrewniaczym nie można wymuszać kojarzenia wsobnego i należy zapewnić izolację genetyczną od podobnych kolekcji).
- Ogrodnictwo wysokiej jakości jest podstawą zminimalizowania utraty osobników (poprzez

hodowlę w warunkach zbliżonych do naturalnych) i maksymalizacji plonu nasion (poprzez redukcję konkurencji i optymalizację kwitnienia i owocowania).

- Najlepiej kojarzyć rośliny metodą wzajemnego krzyżowania w parach, jednak należy liczyć się z dużą pracochłonnością tego zabiegu, w związku z czym można wykonać krzyżowanie w największej możliwej liczbie kombinacji; z wyrównaniem udziału pyłku z różnych roślin rodzicielskich.
- Aby wykorzystać wczesne i późne terminy kwitnienia, należy przeprowadzić ręczne zapylenie w różnych terminach.
- W miarę możliwości, należy osobno przechowywać partie nasion z różnych roślin macierzystych i stosować takie same ilości z każdej z nich w celu wytworzenia kolejnego pokolenia nasion. Jeśli nie ma takiej możliwości, z każdej rośliny macierzystej należy zebrać jednakową liczbę nasion i złączyć wszystkie nasiona w kolekcję; kolejne pokolenie należy wybrać losowo i nie powinno się ono składać z mniejszej liczby osobników niż pokolenie poprzednie, aby uniknąć wąskiego gardła.
- Warunki hodowli i wyniki odtwarzania należy w pełni udokumentować.

DYSTRYBUCJA NASION

Szczegóły dostępne w *Temacie 10*.

- Dla kolekcji o wystarczającej wielkości, odpowiednim poziomie kiełkowania i potwierdzonym rozpoznaniu należy sporządzić listy nasion; na które nie należy wprowadzać kolekcji o zastosowaniu ograniczonym przez regulacje prawne ani kolekcji gatunków inwazyjnych.
- Bank nasion musi przechowywać podstawowy zapas nasion, który nie podlega udostępnianiu. Można go zabezpieczyć albo poprzez fizyczne oddzielenie zapasu podstawowego i aktywnego, albo poprzez zastosowanie systemu kontroli zasobów z marginesem bezpieczeństwa w bazie danych.
- Ze względu na prawo narodowe i kwestie własności zasobów genowych, próbki nasion przesyła się zwykle na mocy porozumienia o transferze materiału (MTA), które określa dopuszczalny sposób wykorzystania nasion, możliwość ich przekazania kolejnej instytucji oraz sposób podziału korzyści z wykorzystania nasion.
- Przesyłając materiał za granicę kraju należy przestrzegać przepisów fitosanitarnych, CITES i Dyrektywy Siedliskowej.
- Próbkę należy przesyłać w opakowaniach foliowych z załączonym paszportem i danymi o kiełkowaniu.
- Bank nasion powinien przechowywać informację na temat odbiorców nasion i sposobie ich wykorzystania. Dane te przydają się w przypadku konieczności wykazania wartości kolekcji banku nasion. W miarę możliwości, opiekunowie kolekcji powinni omawiać typy kolekcji żądane przez potencjalnych użytkowników, co zapewni maksymalne użytkowanie kolekcji.

Cel opracowania

Celem niniejszego dokumentu jest zapewnienie możliwie najlepszego wsparcia wszystkim zaangażowanym w długoterminową ochronę próbek nasion roślin dziko rosnących. Podręcznik został pomyślany raczej jako przewodnik niż podręcznik w ścisłym tego słowa znaczeniu. Bardziej szczegółowe, polecane podręczniki to (dla roślin uprawnych - Rao *i in.*, 2006; nasiona drzew - Schmidt, 2000; gatunki dzikiej flory – CPC, 1986; Bacchetta *i in.*, 2008; Offord & Meagher, 2009); natomiast szczegółowe analizy zagadnienia zawarte są w pracy Smith *i in.*, (2003) zwłaszcza w rozdziale Terry *'ego i in.* (2003). Każdy poruszany temat ma podane przypisy i literaturę. Odnosińniki te tworzą bazę dla standardów przygotowania i przechowywania nasion roślin dziko rosnących w bankach genów. Łącznie, formułują one Standard Banku Genów opublikowany przez FAO / IPGRI (1994). Dokument niniejszy ma ponadto na celu podkreślenie obszaru niezbędnych dalszych badań.

Poruszane zagadnienia

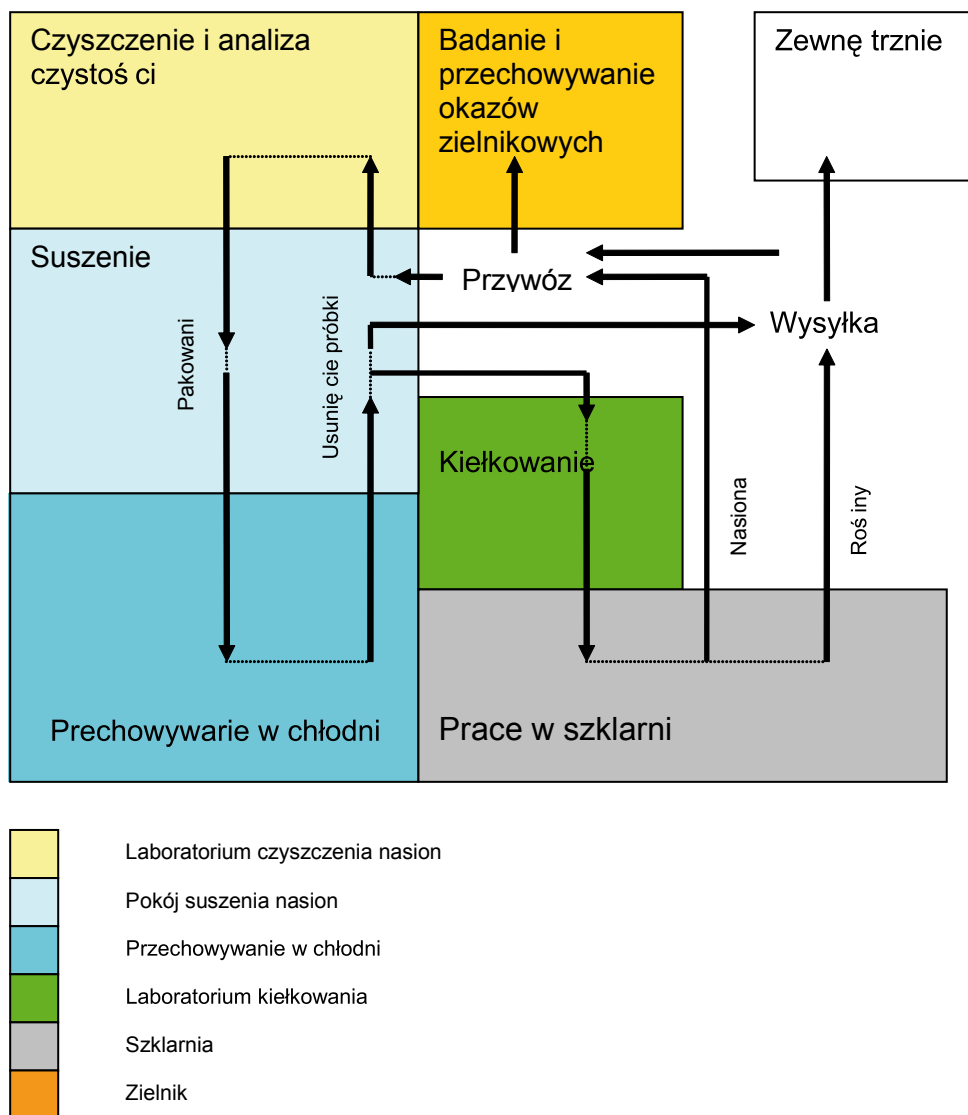
Suszenie nasion, kontrola wilgotności nasion, pakowanie, przechowywanie nasion, kiełkowanie nasion, czyszczenie nasion, weryfikacja rozpoznania, przetwarzanie danych, wysiew nasion i dystrybucja próbek nasion (patrz Rycina 2 – kolejność działań w typowym banku nasion gatunków dzikiej flory oraz Rycina 3 – działania w odniesieniu do obiektów banku nasion).



Rycina 1 Długoterminowe przechowywanie nasion (© RBGK).

Rycina 2	Kluczowe elementy ogólnej procedury w banku nasion (Smith <i>i in.</i> , 2003)
Planowanie i zbiór	Planowanie i zdobywanie zezwoleń ↓ Zbiór w terenie oznaczonych nasion i sprasowanych okazów wraz z pozyskaniem danych terenowych ↓ Szybki transport nasion do banku genów
Procesy technologiczne i oceny	↓ Rozpakowanie próbek, kontrola, suszenie / rozkładanie okazów ↓ Tworzenie rekordów danych na temat kolekcji ↓ Ocena prawdopodobnych warunków przechowywania nasion (jeśli nie są znane) ↓ Czyszczenie nasion¹ ↓ Ocena RTG lub próba krojenia ↓ Oznaczenie ilości nasion ↓ Suszenie ↓ Określanie wilgotności nasion ↓ Wstępna próba kiełkowania²
Przechowywanie i użytkowanie	↓ Pakowanie i duplikacja próbek bezpieczeństwa³ ↓ Przechowywanie w niskich temperaturach ↓ Charakterystyka i ocena⁴ ↓ Dystrybucja opisanych pod-próbek do użytkowników (po pewnym czasie) ↓ Ponowne próby kiełkowania (po pewnym czasie) ↓ Wysiew / rozmnożenie kolekcji (jeśli trzeba)⁵

- 1 Czasem etap czyszczenia poprzedzony jest procesem osuszania. Na tym etapie można zwielokrotnić ilość małych próbek tak jak w procedurze dla materiału zbieranego w terenie.
- 2 Etap ten czasem wykonuje się dopiero po przechowywaniu, w celu sprawdzenia żywotności nasion po osuszeniu i zamrożeniu. Wymaga pojemnika z możliwością wielokrotnego otwierania i zamykania.
- 3 Zdublikowane próbki należy przechowywać w możliwie odległych bankach nasion.
- 4 Odpowiednio.
- 5 Procedura po zbiorze taka jak dla materiału zebranego w terenie.



Rycina 3 Główne procesy i obiekty banku nasion.

TEMAT 1. CZYSZCZENIE NASION

Podsumowanie autorstwa Gianni Bedini (Ogród Botaniczny w Pizie) na podstawie doświadczeń of UVEG, MNHN, RBGK i Ogródu Botanicznego w Pizie oraz związanych z nimi dyskusji.

Komentarz ogólny

Czyszczenie nasion jest to usuwanie wszystkich części i tkanek otaczających nasiona, jak również materiału o pochodzeniu innym niż roślinne (jak na przykład owady lub grudki gleby) i nasion innych gatunków (patrz: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/14-Seed%20cleaning.pdf>). Pomimo, że proces ten zabiera dużo czasu i wymaga biegłości, znacznej ilości miejsca w laboratorium oraz specjalistycznego wyposażenia, niesie on kilka korzyści:

- Umożliwia zaoszczędzenie miejsca w chłodni. Jeśli czyszczenie przeprowadzane jest przed suszeniem, pozwala również zaoszczędzić miejsce w suszarni / pokoju suchym.
- Jest pomocny podczas wzrokowego przeglądu partii nasion w celu oddzielenia i usunięcia nasion pustych, niedojrzałych, uszkodzonych bądź zainfekowanych (bezużytecznych dla celów ochrony przyrody).
- Usuwa patogeny (grzyby, bakterie i wirusy), które łatwiej przenosić na fragmentach roślin niż na nasionach. Jest to zgodne z przepisami fitosanitarnymi i stanowi ułatwienie przy wysyłce nasion.
- Ilość nasion łatwiej określa się dla partii oczyszczonych niż nieoczyszczonych.

Optymalnie, każdą partię nasion należy dokładnie oczyścić aż do oddzielenia wszystkich towarzyszących części roślinnych. W praktyce nie jest to możliwe dla wszystkich gatunków, zwłaszcza wytwarzających określony typ owoców i małe nasiona. Owoce pękające i duże nasiona oczyszcza się stosunkowo łatwo. Oddzielanie drobnych nasion od fragmentów owocni o porównywalnej wielkości, formie i gęstości może być zbyt trudne do przeprowadzenia w dogodnym czasie. Podobnie, ekstrakcja nasion z owoców nie pękających (skrzydlaki, niełupki i orzeszki) może trwać zbyt długo lub powodować zniszczenia nasion. Wówczas może się okazać, że próbki trzeba utworzyć z nasion w takim stanie, w jakim zostały dostarczone do banku.

Nasiona dzikich gatunków należy czyścić ręcznie, z zastosowaniem odpowiedniego wyposażenia mechanicznego. Procesy automatyczne, powszechne w masowym przyjmowaniu nasion rolniczych, ogrodniczych i leśnych, nie są odpowiednie dla dużych ilości małych i zróżnicowanych (przykładowo różniących się wielkością i kształtem) partii nasion. Czas potrzebny do oczyszczenia automatycznego wyposażenia pomiędzy czyszczeniem poszczególnych próbek w celu uniknięcia zanieczyszczenia i zmieszania prób generuje zbyt wysokie koszty w przypadku dużych ilości małych próbek. Niektóre kolekcje, zwłaszcza z populacji gatunków zagrożonych, mogą składać się tylko z kilku nasion. Ponadto maszyny mogą wymagać kalibracji dla poszczególnych gatunków i mogą nie poradzić sobie z dużym zróżnicowaniem kształtów owoców i nasion oraz wielkością i masą poszczególnych próbek. Cenne zróżnicowanie genetyczne można wówczas utracić. Niektóre typy sprzętu mogą również powodować znaczne uszkodzenia mechaniczne nasion prowadzące do utraty ich żywotności.

Czyszczenie nasion gatunków dziko rosnących wymaga większych umiejętności niż można by się spodziewać. Pracownicy muszą posiadać niezbędną wiedzę na temat morfologii owoców i nasion oraz sposobu interpretacji obrazu pod mikroskopem. Muszą także znać techniki odpowiednie dla różnych typów owoców/nasion i umieć je stosować.

Większość procesów czyszczenia nasion ułatwia się poprzez ich suszenie. Wyjątkiem są mokre owoce, gdzie doradza się ekstrakcję nasion przed suszeniem.

Podczas gdy proste zabiegi suszenia mogą mieć miejsce w terenie bezpośrednio po zbiorze, większość procesów lepiej wykonywać w laboratorium z zapewnioną odpowiednią przestrzenią roboczą, ochroną przed kurzem i następującym wyposażeniem:

Sita, zatyczki i szczotka
System usuwania kurzu (maski)
Separator nasion (dmuchawka, wialnia)
Stereoskop i wyposażenie do krojenia
Wyposażenie "mokre"
System usuwania odpadów



Rycina 4 Laboratorium czyszczenia nasion. (© RBGK)

TEMAT 1A. WYPOSAŻENIE I TYPOWE PROCESY

Komentarz ogólny

Sita, zatyczki i szczotki

W bankach nasion stosuje się zazwyczaj sita druciane ze stali nierdzewnej o różnych rozmiarach oczek. Umożliwiają one rozdział nasion i zmieszanych z nimi zanieczyszczeń na 2 lub więcej frakcji. Obiekty większe od rozmiaru oczek pozostają na sicie, podczas gdy pozostałe przechodzą przez oczka. Jeśli zanieczyszczenia są większe niż nasiona, wówczas można zastosować średnicę oczek nieco większą od nasion w celu zebrania zanieczyszczeń na sicie, a oczyszczonych nasion w tacy umieszczonej poniżej. Jeśli, vice versa, zanieczyszczenia są mniejsze od nasion, wówczas można zastosować nieco mniejszą średnicę oczek niż nasion w celu zatrzymania oczyszczonych nasion na sicie, a zanieczyszczeń na tacy poniżej. Można także zastosować kombinację różnych wielkości oczek, aby oddzielić nasiona od większych i mniejszych zanieczyszczeń. Metoda ta nie sprawdzi się, jeśli zanieczyszczenia są wielkości nasion. W takim przypadku nasiona należy przechowywać z zanieczyszczeniami lub oczyścić je inną metodą, na przykład poprzez ich toczenie po pochylej powierzchni lub za pomocą wialni (patrz poniżej).

Nieoczyszczona partia nasion może być delikatnie przetarta przez sito przy pomocy gumowej zatyczki. Przecieranie pomaga oddzielić kruche zanieczyszczenia, przesiewając je przez oczka sita, jednak zbyt energiczne przecieranie może uszkadzać nasiona, przyciskając lub rozłamując je o sito. Jeśli nasiona są kruche, można je przecierać ręcznie: w takim wypadku pracownik musi nosić rękawiczki lateksowe lub z PVC, aby chronić palce jednocześnie nie tracąc odpowiedniego wycucia nasion w palcach.



Rycina 5 Czyszczenie nasion z zastosowaniem sita i zatyczki gumowej. (© RBGK)

Nasiona należy przejrzeć pod kątem uszkodzeń przy pomocy stereoskopu: jeśli zauważy się uszkodzenie, należy zastosować delikatne polerowanie. Należy także skontrolować poszczególne frakcje: jeśli są w nich zmieszane odpady i nietknięte nasiona, muszą one ponownie przejść przez sito.

Sita, tace i zatyczki należy dokładnie czyścić pomiędzy obróbką poszczególnych partii nasion aby uniknąć mieszania i krzyżowania zanieczyszczeń. Najlepszym przyrządem do czyszczenia nasion jest stalowa szczotka.

Systemy usuwania kurzu lub maski

Zwłaszcza w trakcie przesiewania / przedmuchiwania nasion lub suchych owoców powstaje dużo kurzu, złożonego z drobnych cząstek, które mogą być wdychane przez pracowników i osiadać na wyposażeniu laboratoryjnym. Część kurzu może powodować podrażnienia płuc i alergię. Dlatego też, czyszczenie nasion powinno być prowadzone pod wyciągiem z filtrem kurzu lub w wydzielonym pomieszczeniu, gdzie pracownicy noszą maski zabezpieczające przed kurzem (o odpowiednim standardzie, np. EN 149: 2001 FFP3). Oczywiście, ochrona działa dotąd, dopóki sprawny jest filtr, dlatego też filtry w wyciągach i maski trzeba regularnie wymieniać.



Rycina 6 Dygestorium do czyszczenia nasion. (© RBGK)

Separator nasion (wialnia)

Urządzenie to umożliwia separację nasion i zanieczyszczeń w oparciu o różnicowanie gęstości. Generuje ono odpowiedni przepływ powietrza przechodzący przez partię nasion umieszczoną na drobnym sicie wpasowanym w pusty cylinder. Strumień powietrza przechwytyuje "lekki" materiał, który jest unoszony wzdłuż cylindra i przechwytywany przez pojemnik odpadków na szczycie cylindra, podczas gdy "ciężki" materiał pozostaje w cylindrze. Działanie to opiera się na identycznej zasadzie co przedmuchiwanie, jest jednak bardziej godne zaufania, gdyż strumień powietrza można dostosować do żądanej wartości.

Ważne, by sprawdzić czy separacja jest tak efektywna, jak to możliwe i pozostawia wszystkie prawidłowo wykształcone nasiona na sicie, a wszystkie zanieczyszczenia – bez żywotnych nasion – w pojemniku odpadów. Osiąga się to poprzez precyzyjny dobór strumienia powietrza, przeprowadzony na zasadzie prób i błędów. Z małą próbką w koszu, strumień powietrza ustawia się najpierw na niską prędkość, wystarczającą jedynie do uniesienia małej ilości zanieczyszczeń do pojemnika odpadów, co można rozpoznać patrząc na cylinder (zwykle przezroczysty). Zanieczyszczenia w pojemniku są następnie sprawdzane pod stereoskopem w celu wyszukania żywych nasion. Jeśli w odpadzie brak nasion, należy delikatnie wzmocnić strumień powietrza i powtórzyć procedurę. W momencie, gdy prawidłowo ukształtowane nasiona dostają się do pojemnika odpadów, wielkość strumienia powietrza trzeba przestawić do poprzedniej wartości. Separacja nasion bywa bardzo efektywna, gdy stosuje się ją po przesianiu przez sito.

Tak jak przy innych technikach, wyposażenie (kosz, cylinder, pojemnik odpadów) należy starannie czyścić pomiędzy kolejnymi partiami nasion. Może się pojawić statyczna elektryczność, zwłaszcza w cylindrze, ze powodu tarcia strumienia powietrza. Dlatego też, zaleca się stosowanie antystatycznej odzieży i spreju.

Stereoskop i wyposażenie do krojenia

Stereoskop bywa przydatny w wielu zadaniach związanych z czyszczeniem nasion, takich jak kontrola czystości próbki nasion, kontrola frakcji odpadów pod względem obecności żywych, nieuszkodzonych nasion, a także podczas próby krojenia.



Rycina 7 Mikroskop stereoskopowy.
(© RBGK)

Próbie krojenia przeprowadza się w celu określenia liczby nasion pustych (to znaczy nasion z bielmem i/lub bez osi zarodkowych albo zniszczonymi osiami zarodkowymi). Ponieważ jest to test destruktywny, przeprowadza się go na pod-próbkach (zwykle 50 sztuk nasion) partii nasion (patrz także: analiza rentgenowska). Nasiona w pod-próbkach przecina się skalpelem lub innym odpowiednim narzędziem i sprawdza na obecność nieuszkodzonego bielma i zarodka, czego wynikiem jest obliczenie wskaźnika nasion pełnych do pustych. Jeśli udział nasion pustych jest znaczny, przekraczając na przykład 50%, próbkę można ponownie poddać czyszczeniu, jednak robi się to tylko gdy działanie takie jest możliwe – choćby ze względu na czas pracy personelu.

Wyposażenie do czyszczenia na mokro

Nasiona wydobyte z owoców mięsistych mogą wymagać szybkiego oczyszczenia na mokro w celu usunięcia pozostałości owocni, które nadal pozostają na nich po ekstrakcji (patrz poniżej). Mimo że nie jest to zalecane w bankach nasion, wodę można też wykorzystać do separacji nasion przez splawianie: nasiona puste będą unosić się na powierzchni wody, podczas gdy nasiona pełne zatoną po zanurzeniu.

Usuwanie odpadów

Odpady mogą zawierać patogeny i żywe nasiona gatunków inwazyjnych. Jeśli w banku nasion przechowuje się materiał pochodzenia egzotycznego, oba te czynniki mogą stanowić poważne zagrożenie dla rodzimych ekosystemów w przypadku gdy wydostaną się poza bank nasion. Dlatego też wszystkie zanieczyszczenia należy dokładnie zamknąć w banku nasion: dobre rozwiązanie to zamknięcie ich torebkach plastikowych umieszczonych w starannie oznakowanych pojemnikach na odpady. Kiedy torebki są wypełnione, należy je ściśle zamknąć i wysłać do autoryzowanego odbiorcy odpadów. Spalanie odpadów o standardzie medycznym to najbezpieczniejszy sposób zapobiegania rozprzestrzenianiu żywego materiału i należy być stosowane w miarę możliwości.



Rycina 8 Kosz na odpady roślinne do spalania.
(© RBGK)

Czyszczenie mięsistych owoców

Mokre owoce powinny dojrzewać w warunkach wysokiej wilgotności względnej przed przystąpieniem do ekstrakcji i suszenia nasion. Nasiona można wyluszczyć przez krojenie, łamanie, wyciskanie owocu lub zgniatanie przez sito. Można zastosować letnią wodę, aby usunąć lepkie resztki owocni. Nasiona rozkłada się wówczas cienką warstwą i umieszcza w suchym pokoju. Jeśli nasiona pokryte są lepka warstwą, suszenie umożliwia jej usunięcie poprzez delikatne pocieranie ręką.

Przypadek szczególny 1: lepki miąższ owocu

Daphne alpina subsp. *alpina* produkują małe pestkowce z drobnym, lepkim miąższem. Gdy pestkowce są rozgniatane przez sito, twarde części otoczone przez pozostałości owocni są wyciskane i skleja się ze sobą w duże bryłki. Kleisty miąższ nie rozpuszcza się i nie jest usuwany przez wodę. Praktyczniejszym rozwiązaniem jest w tym przypadku toczenie pestek w popiele do momentu, aż będą nim całkowicie pokryte. W ten sposób miąższ staje się mniej kleisty i można go usunąć poprzez delikatne toczenie owoców na sicie z oczkami mniejszymi niż wielkość pestek.

Przypadek szczególny 2: przejrzane owoce

Mięsiste owoce (np. jagody *Psiankowatych*) mogą wymagać częściowego lub pełnego czyszczenia gdy są przejrzane lub gdy zostały uszkodzone bądź rozgniecione podczas zbioru, aby uniknąć fermentacji. Stosując sito i zimną bieżącą wodę, należy usunąć z owocu tyle miąższu, ile się da. Nasiona należy następnie umieścić w suchym pokoju lub – jeśli odbywa się to w terenie – pozostawić do wyschnięcia na powietrzu na sicie z drobnego drutu lub gęstej bibule do momentu powierzchniowego osuszenia przed pakowaniem i transportem w torebkach z dzianiny.

Przypadek szczególny 3: owoce rozsiewane w stanie niedojrzałym

Gatunki leśne (np. *Anemone nemorosa*) i wodne (np. *Caltha palustris*) mogą rozsiewać owoce o niedojrzałych nasionach. W takich przypadkach, nasion nie można ekstrahować od razu po zbiorze; należy najpierw umożliwić im dojrzewanie w warunkach wysokiej wilgotności względnej i dopiero później wydobyć je z owoców.

Czyszczenie suchych owocostanów

Nasiona w suchych owocostanach czyści się metodą przecierania gumową zatyczką przez sito. Owocostany umieszcza się w sicie z oczkami odpowiedniej wielkości, tak aby nie pozwolić na przechodzenie przez nie nasion, a następnie delikatnie toczy zatyczką do momentu uwolnienia nasion i rozkruszenia suchych materiałów w małe części, które przechodzą przez oczka.

Zastosowane zbyt energicznie, zatyczki mogą uszkodzić nasiona. Dlatego też ważne jest kontrolowanie nasion w trakcie czyszczenia; jeśli zaobserwuje się jakiegokolwiek uszkodzenie, należy zmniejszyć nacisk. Jest to istotne zwłaszcza w przypadku nasion kruchych, które łatwo rozłamać po przyciśnięciu do sita. W takich przypadkach nasiona można toczyć w dłoniach. Rękawiczki PVC lub lateksowe są ochroną dla palców.

Przecieranie przez sito prowadzi się do uzyskania oczekiwanego efektu. Jeśli dalsze czyszczenie doprowadzi do uszkodzenia nasion lub jest zbyt czasochłonne, można zastosować inną technikę, taką jak dmuchanie lub można zamrozić kolekcję w stanie niedoskonałym, odnotowując ten fakt w bazie danych. Jeśli to możliwe, można oczyścić pod-próbki w momencie ich wyjęcia z banku nasion w celu wykonania próby kiełkowania lub wysiewu.

Przypadek szczególny 1: pękające owoce suche

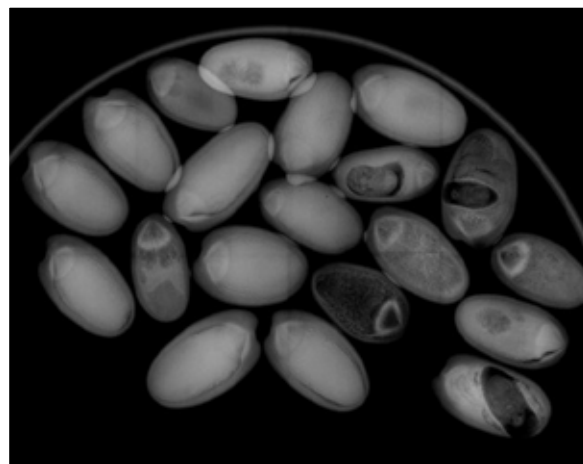
Nasiona zebrane w stanie pełnej dojrzałości w suchych, masywnych owocach lub zarodniach są czyszczone szybko i prosto poprzez staranne otwieranie owoców i ręczną separację nasion. Zarodnie, łuszczyńki i strąki można otwierać wzdłuż ich naturalnej linii pęknięcia, a następnie delikatnie wytrząsać lub wyciskać na tacę, aby uzyskać ich ładunek nasion wolny od zanieczyszczeń: z zachowaniem ostrożności, zadanie to można przeprowadzić efektywnie w terenie.

Przypadek szczególny 2: niepękające owoce suche

Owoce takie jak orzechy, orzeszki, skrzydlaki i podobne są ukształtowane jako całość i tak też powinny być przechowywane. Zasadą ogólną jest, że usunięcie jakiegokolwiek części naturalnej jednostki rozsiewania (jak skrzydełko, włoski, plewki itp.), zwłaszcza gdy stanowi z nią integralną całość, powinno być prowadzone troskliwie a najlepiej unikane, ponieważ może to uszkadzać nasiona.

Analiza rentgenowska

Technika ta umożliwia ocenę nasion pustych lub uszkodzonych/zainfekowanych oraz określenie liczby nasion w nasionach nie otwierających się. Jest to zaawansowana technicznie alternatywa metody krojenia, wymagająca specjalistycznego wyposażenia (aparat RTG a w przypadku sprzętu nie-cyfrowego także materiały fotograficzne, ciemnia i pudełko świetlne) i przeszkolonego personelu. W porównaniu z prostym testem krojenia, pozwala ona na szybsze, dokładniejsze i lepiej udokumentowane oceny. Mimo że technika jest nie destrukcyjna, aby zapobiec uszkodzeniom genetycznym, testuje się tylko pod-próbkę, a nasiona te nie są ponownie włączane do kolekcji. Nasiona te można jednak poddać próbie kiełkowania (wyniki oceny mogą być równe lub nieco gorsze niż w przypadku nasion nie poddanych wcześniej działaniu promieni RTG, nie można jednak pominąć możliwej zmiany genetycznej materiału).



Rycina 9 Zdjęcie RTG *Albizia bernieri* z widocznymi nasionami pustymi, spasożytowanymi i zdrowymi. (© RBGK)

Możliwe składowe partii nasion:

	Składnik testu żywotności	Widoczność w teście RTG
Nasiona nie spoczynkowe*	Tak	Pełne
Nasiona spoczynkowe*	Tak – zastosować próbę TZ lub przejrzeć w celu oddzielenia od nasion martwych	Pełne
Martwe nasiona	Tak	Pełne
Puste nasiona	Nie - wykluczyć	Puste
Nasiona uszkodzone przez owady	Nie – wykluczyć, chyba że uszkodzenie jest powierzchowne	Uszkodzone
Zanieczyszczenia	Nie - wykluczyć	Odpad

Definicje – dostępne w [Temacie 6](#)

$\% \text{ \% żywotność} = (\text{Nasiona nie spoczynkowe} + \text{nasiona spoczynkowe}) / (\text{całkowita liczba nasion} - \text{nasiona puste} - \text{nasiona uszkodzone przez owady}) \times 100$

Oszacowanie liczby nasion

Oszacowanie liczby nasion ma znaczenie w planowaniu zastosowania kolekcji (próba kiełkowania, duplikacja, konserwacja, propagacja, restytucja itd.). Sugeruje się następującą procedurę:

- Zważyć całą partię nasion
- Zważyć 5 próbek z 50 nasion
- Obliczyć średnią masę 50 nasion
- Obliczyć 95% górnego przedziału ufności (UCL)
- Oszacować liczbę nasion: $(\text{masa całej partii nasion}/\text{UCL}) \times 50$

Należy zauważyć, że sugerowana procedura prowadzi do niedoszacowania liczby nasion, co jest lepsze niż przeszacowanie, które wystąpiłoby w przypadku prostej kalkulacji biorącej pod uwagę jedynie masę pojedynczej próbki złożonej z 50 nasion, tzn. $(\text{całkowita masa partii nasion}/\text{masa 50 nasion}) \times 50$. W takim przypadku, gdyby masa zważonej próbki 50 nasion była znacząco niższa od przeciętnej, wynik byłby za duży.

Metodą alternatywną może być monitoring zebranej masy.

TEMAT 2. SUSZENIE NASION

Podsumowanie autorstwa Costantino Bonomi (MTSN) na podstawie prezentacji Robina Proberta (RBGK), innych prezentacji UPM i NBGB oraz prowadzonych dyskusji.

Komentarz ogólny

Prawidłowe suszenie jest kluczem do zapewnienia maksymalnej żywotności nasion większości gatunków¹. Popularne artykuły zazwyczaj kładą przesadny nacisk na proces zamrażania, pomijając suszenie. Modele empiryczne udowadniają jednakże istotność suszenia w procesie długotrwałego przechowywania.



8 lipca

16 lipca

29 lipca

Rycina 10 Dojrzewanie *Fritillaria tubaeformis* prezentujące moment naturalnego rozsiewania. (© MTSN)

TEMAT 2A. HETEROGENICZNOŚĆ PRÓBEK A TEMPO SUSZENIA

Komentarz ogólny

Nasiona i owoce należy zbierać wówczas, gdy są w pełni dojrzałe i zwykle w momencie ich naturalnego rozsiewania (Rycina 10). Oczywiście, w przypadku gatunków wymagających do rozprzestrzenienia nasion np. pożarów (pirofity), owoce zbiera się wiele lat przed momentem rozsiewu naturalnego. Z drugiej strony, pewne gatunki cechują się nagłym i gwałtownym rozsiewem nasion, a w przypadku storczyków, nasiona rozsiewane są przed pełnym wyschnięciem kapsuł. Wówczas nasiona zbiera się przed naturalnym rozsianiem. Owocom umożliwia się następnie dojrzewanie i rozsiewanie nasion w papierowych kopertach.

Jednak w naturze nasiona i owoce gatunków dzikich często cechują się zróżnicowaniem okresu owocowania. Zróżnicowanie to jest przyczyną problemów pojawiających się w całym procesie przygotowania nasion do przechowywania po zbiorze, także podczas suszenia. Gwałtowne osuszenie może znacząco zmniejszyć trwałość nasion niedojrzałych i pochodzących z dojrzałych mięsistych owoców. Liczne spośród najnowszych badań (Probert *i in.*, 2007 oraz przeglądowe prace Hay'a i Probert, 1995 i 2000) wykazały, że jakość nasion wzrasta jeśli niedojrzałe nasiona i owoce poddane zostały wolniejszemu lub opóźnionemu suszeniu. Co więcej, niedawne badania RBGK (Butler *i in.*, 2009) wykazały, że nasiona niedojrzałe są elastyczne wobec wahań wilgotności względnej i potrafią nie tylko przetrwać okresy przejściowych poziomów wilgotności względnej, ale mogą kontynuować proces dojrzewania po ponownych nawilżeniu.

¹ Większość gatunków produkuje nasiona odporne na osuszanie. Są to tzw. nasiona typu orthodox. Więcej informacji na ten temat – patrz: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/10-Desiccation%20tolerance.pdf>; informacje na temat wpływu suszenia na trwałość nasion – patrz Pritchard i Dickie, 2003; aby sprawdzić czy typ nasion danego gatunku jest rozpoznany – patrz: <http://kew.org/data/sid/>.

Zalecenia

Zaleca się dojrzewanie nierozwiniętych nasion i owoców przez 2-3 tygodnie w warunkach zbliżonych do warunków ich wzrostu przed zbiorem. Zazwyczaj proces dojrzewania przejawia się w zmianie zabarwienia owoców, często z zieleni na czerwień lub barwę słomkową. Wewnątrz owoców, nasiona także zmieniają kolor, zwykle od bieli do ciemniejszych barw.

W przypadku nasion z dojrzałych mięsistych owoców, zaleca się stopniowe osuszanie w warunkach początkowych 60-70 % wilgotności względnej, 20-25 °C, przez 1-2 tygodnie; wszystkie pozostałe nasiona w pełni dojrzałe można suszyć w warunkach podanych poniżej.

Jeśli to możliwe, nasiona lub owoce, które z pewnością znajdują się w różnych stadiach dojrzewania, powinny zostać rozdzielone w pod-próbki w celu osiągnięcia przez wszystkie dojrzałości i osuszenia ich według wskazówek powyżej; dojrzałe nasiona oraz nasiona wyekstrahowane z dojrzałych owoców nie mięsistych należy osuszyć natychmiast (w zalecanych poniżej warunkach) w celu zmniejszenia strat żywotności.

Brak jest jednoznacznego oszacowania tempa, w którym różne nasiona w warunkach pokoju suchego osiągają punkt równowagi. Personel banku powinien upewnić się, że duże nasiona o grubej okrywie są przed zamrożeniem dobrze wysuszone.

Priorytetowość badań

Przydatne będzie lepsze określenie tempa wysychania nasion różnych gatunków.

TEMAT 2B. OBIEG POWIETRZA

Komentarz ogólny

Za wyjątkiem nasion pozyskanych z owoców mięsistych (patrz wyżej), proces osuszania powinien być odpowiednio gwałtowny w celu skrócenia do minimum czasu, w którym nasiona przebywają w warunkach wysokiej wilgotności. Tempo suszenia zależy od prędkości obiegu powietrza nad powierzchnią warstwy nasion. Większa prędkość powietrza usuwa wilgoć z powierzchni nasiona i zwiększa gradient wilgotności (potencjał wodny) między zewnętrzną i wewnętrzną częścią nasiona. Nasiona przechowywane ciasno w dużej lub zamkniętej torbie, ze słabym obiegiem powietrza, mogą wytwarzać wilgotne środowisko lokalne, które wpływa na trwałość nasion nawet jeśli umieszczone są w dobrych warunkach do wysychania.

Zalecenia

Aby zwiększyć tempo suszenia, nasiona należy rozłożyć cienką warstwą i zapewnić im bezpośredni dostęp powietrza. Można zastosować sztuczny obieg powietrza.

TEMAT 2C. KONTROLA WYSYCHANIA

Komentarz ogólny

Wilgotność względna równoważna (eRH) wytwarzana w zamkniętej przestrzeni przez nasiona jest lepszym wskaźnikiem stopnia osuszenia niż zawartość wilgoci w nasionach (mc). ERH jest miarą niezależną od zawartości tłuszczu w nasionach.

Jeśli znamy zawartość tłuszczu w nasionach, zawartość wilgoci można określić na podstawie wartości eRH (patrz: <http://data.kew.org/sid/viability/mc1.jsp>). Patrz także: Probert *i in.*, 2003 ogólny pomiar eRH. Patrz: Cromarty *i in.*, 1990 konwersja eRH do mc i odwrotnie.

Zalecenia

Używać pomiaru eRH do kontroli procesu suszenia.

TEMAT 2D. WARUNKI TERMICZNE I WILGOTNOŚCIOWE SUSZENIA

Komentarz ogólny

Nie zaleca się suszenia w wysokich lub bardzo wysokich ($>40^{\circ}\text{C}$) temperaturach, zwłaszcza przed dłuższy czas. Udowodniono, że suszenie w wysokich temperaturach, np. suszenie na słońcu, nie jest szkodliwe jeśli jest staranne monitorowane. Pomimo to, po osiągnięciu przez nasiona pożądanego poziomu wilgotności, zachodzi niebezpieczeństwo nadmiernego narażenia nasion na wysoką temperaturę. Co więcej, duże nasiona mogą pękać pod wpływem wysokich temperatur podczas suszenia. Temperatury suszenia szeroko stosowane w bankach nasion mieszczą się w zakresie $10\text{--}20^{\circ}\text{C}$. Istnieją różnice w opiniach na temat ostatecznego poziomu wilgotności, który powinny osiągnąć nasiona, a w konsekwencji na temat warunków wilgotności względnej odpowiednich do procesu suszenia. Wiele banków nasion przechowuje nasiona podsuszone do ok. 15% wilgotności względnej (przeciętnie 3.5 – 6.5 % zawartości wody zależnie o zawartości tłuszczu w nasionach). W innych bankach nasiona osusza się dużo silniej (Pérez-García *i in.*, 2007 i 2008). Istnieją również banki, gdzie stosuje się nieco wyższe wartości RH (20-25 %), ponieważ potencjał wodny (równoważnik eRH) spakowanych nasion, wysuszonych do 15 % RH, mógłby teoretycznie spaść do poziomu niższego niż optymalny w trakcie długoterminowego przechowywania w temperaturach ujemnych (Vertucci *i in.*, 1994). Istnieją jednak dowody, że zjawisko to nie jest powszechne ani zawsze wykazywane. Różnice te wynikają z faktu stosowania różnych metod badawczych i innych gatunków. Zagadnienie to pozostaje jednym z wielkich pytań bez odpowiedzi w przechowywaniu nasion.

Zalecenia

Banki nasion nie mogą czekać na rozwiązanie zagadnienia optymalnej zawartości wody. Obecnie nie ma możliwości wyznaczenia i zarekomendowania jednej konkretnej wartości wilgotności nasion do zastosowania w każdych warunkach. Dlatego też, dopóki brak jest nowych pełnych danych, zaleca się suszenie nasion do poziomu ok. 15 % RH (w przybliżeniu 3.5 – 6.5 % zawartości wody zależnie od zawartości tłuszczu w nasionach) w $10 - 20^{\circ}\text{C}$, jeśli mają one być przechowywane w temperaturach ujemnych. Suszenie do niższego poziomu wilgotności zaleca się, jeśli nasiona będą przechowywane w temperaturze powyżej 0°C .

Priorytety badawcze

Zaleca się dalsze badania w celu zdobycia wiedzy na temat docelowego poziomu wilgotności. Możliwe jest oczywiście, że optymalna wartość RH do przechowywania nasion różni się u poszczególnych gatunków.

Należy przeprowadzić wspólne doświadczenie w celu określenia, czy istnieje możliwość wyznaczenia ogólnej wartości docelowej poziomu wilgotności, którą można zastosować dla różnych grup taksonomicznych, pochodzących z różnych regionów biogeograficznych i mających zróżnicowane wymagania ekologiczne. Głównym celem doświadczenia powinny być gatunki, które na podstawie istniejących danych można uznać za krótkotrwałe w warunkach banku nasion. Gatunki te są bardziej wrażliwe na wpływ zróżnicowanych warunków suszenia na potencjalną trwałość.

Banki nasion powinny opublikować dane dotyczące przechowywania nasion (w tym stosowane warunki przechowywania) w periodykach, raportach technicznych lub on-line, tak jak w Seed Information Database (Liu *i in.*, 2008: <http://kew.org/data/sid/>).

Sugerowane doświadczenie

Każdy z uczestników eksperymentu wybiera minimum 1 (w miarę możliwości większą liczbę) gatunek z krótkotrwałymi nasionami typu orthodox, znanymi wymaganiami dotyczącymi kiełkowania oraz posiadającą dużą ilość nasion. Partie nasion należy poddać różnym wariantom procesu suszenia, a następnie kontroli procesu starzenia i kiełkowania. Przykładowo, partie nasion można podsuszyć do 3 różnych poziomów wilgotności (25, 15 i 5 % RH) w stałej temperaturze (15°C). Te poziomy wilgotności, bardziej lub mniej odpowiadają trzem poziomom zalecanym przez różne banki, to jest: National Center for Genetic Resources Preservation w Fort Collins, USA,

standardy banków nasion FAO / IPGRI z 1994 roku i standardy silnego osuszania. Nasiona po osuszeniu należy przechowywać odpowiednio w trzech różnych temperaturach: 30, 5 i minus 20 °C. Żywotność należy kontrolować z częstotliwością 6 miesięcy przez 10 lat z wykorzystaniem 4 próbek po 25 nasion w każdym teście. Całkowita liczba nasion wykorzystanych do doświadczenia przez jednego badacza dla jednego gatunku wynosi $3 \times 3 \times 21 \times 4 \times 25 = 18,900$ nasion. Wartości P50 należy udostępnić i porównać dla różnych badanych gatunków.

TEMAT 2E. SPRZĘT DO SUSZENIA

Komentarz ogólny

Metodyka dopuszcza stosowanie następujących typów pojemników:

(a) Zamknięte pojemniki z medium suszącym. Medium to, to substancja higroskopowa, jak żel krzemionkowy, stosowany to pochłaniania pary wodnej z powietrza. Metoda ta jest tania, jednak końcową zawartość wilgoci można kontrolować w wąskim zakresie zależnym od wskaźnika nasiona:żel, wilgotności żelu i czasu. Można ją stosować do względnie małej liczby kolekcji.

(b) Suszarki – inkubatory. Efektywny sposób suszenia nasion opiera się na zastosowaniu specjalnych typów chłodziarek, w których można kontrolować poziom wilgotności. Wilgotność tę monitoruje się wykorzystując sondę z funkcją zapisu danych. W rezultacie powstaje mały pokój suchy (patrz niżej). Wewnątrz inkubatora powietrze krąży dzięki pracy wiatraka. Metoda ta umożliwia kontrolowanie końcowej zawartości wody w wystarczającym zakresie i można ją stosować dla większych partii nasion niż w przypadku metody (a).

(c) Pokój suchy. Jest to najdroższa z istniejących metod, zaleca się ją jednak w przypadku banków przyjmujących dużą liczbę prób rocznie. Pomieszczenie można dostosować do wymaganej wilgotności względnej i temperatury wykorzystując suszarki sorpcyjne i chłodziarki. Suszarki zwykle wykorzystują żel krzemionkowy lub chlorek litu (LiCl) jako medium suszące. Suszarki łączą się z chłodziarkami, a więc także z dobrze izolowanym pokojem poprzez kanał roboczy (z obiegiem powietrza). Osobny zestaw kanałów umożliwia wyprowadzenie na zewnątrz budynku wilgoci wytworzonej podczas fazy regeneracji w suszarce. Stopień regeneracji medium suszącego ustawia się sterownikami połączonymi z higrometrem wewnątrz pokoju suchego. Kolekcje można pozostawić w pokoju suchym i zająć się nimi w dogodnym czasie. Czytelników odsyła się również do Liningtona (2003) – wystrój pokoju suchego: (http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_33.pdf).



Rycina 11 Suszarka inkubator. (© UPM)



Rycina 12 Pokój suchy. (© MAICh)

(d) Zamknięte pojemniki z nasyconym roztworem soli. Nasycone roztwory soli, takich jak chlorek litu, wytwarzają specyficzną wilgotność względną i umożliwiają jej aktywne utrzymanie, absorbując i uwalniając parę wodną. Chlorek litu jest do tego celu szczególnie przydatny, ponieważ wykazuje stosunkowo wysoką odporność na temperaturę. Nasiona umieszczone w pojemniku ponad roztworem (na platformie) wyschną do równoważnej z pomieszczeniem wilgotności względnej dla danej temperatury. Może być to przydatne dla bardzo małych partii nasion, należy jednak szczególnie starannie zabezpieczyć się przed rozlaniem roztworu. Niektóre chemikalia mogą być szkodliwe, np. chlorek amonowy lub azotan sodu.

Zalecenia

Nie zaleca się suszenia ciepłem powyżej 35 °C lub w piecu.

Zaleca się zastosowanie pokoju suchego, który można przystosować do osiągnięcia wymaganej wartości RH. Pokój taki jest kluczowym elementem wyposażenia współczesnego banku nasion przyjmującego średnią do dużej (ok. 100 –1000 prób rocznie) ilość prób nasion rocznie. Pokój suchy jest rozwiązaniem elastycznym i może być zastosowany w większości przypadków.

Techniki suszenia nasion w niskiej temperaturze są słabo przebadane, a w rezultacie brak obecnie wystarczających danych dotyczących wpływu tej techniki na nasiona, a zatem pod jej wpływem mogą wystąpić nieprzewidziane zaburzenia w długotrwałym przechowywaniu nasion. Metoda ta, ze względów bezpieczeństwa, nie jest obecnie polecana.

Jeśli bank nasion przyjmuje rocznie niewielką liczbę próbek (załóżmy, że mniej niż 100 rocznie), można wykorzystać różne media suszące – żel krzemionkowy, prażone nasiona lub węgiel drzewny. W każdym przypadku środki te muszą być najpierw podsuszone w piecu, a następnie monitorowane podczas procesu suszenia nasion, aby uniknąć spadku ich aktywności. Dostępne są zaprojektowane specjalnie do suszenia nasion szafy i inkubatory oraz zestawy suszarnicze (szczegóły dostępne po skontaktowaniu się z RBG Kew), takie jak w mini banku nasion w Kew (patrz: <http://shop.kew.org/kew-mini-seed-bank.html>). Patrz także: szafy stosowane w UPM: http://www.etsia.upm.es/banco_germoplasma/inicio_bgv_archivos/Page497.htm.

Wskaźnik stosunku ilości środka suszącego do ilości nasion, zapewniający osuszenie do poziomu bezpiecznego, zależy od poziomu wilgotności nasion przed rozpoczęciem suszenia. Nasiona świeżo zebrane, o dużej zawartości wody, wymagają dużej ilości środka suszącego, może ponadto pojawić się konieczność jego wymiany przed końcem procesu suszenia. Dlatego też zaleca się wstępne podsuszenie nasion w warunkach środowiska, przez 2-3 dni, w celu usunięcia wolnej wody (najłatwiej traconej). Następnie nasiona należy umieścić w zamykanym pojemniku, nad warstwą wybranego medium suszącego.

Pojemność wodna środków suszących jest zróżnicowana. W przypadku żelu krzemionkowego, wystarczy zastosowanie wskaźnika 1:1 objętości środka suszącego w stosunku do objętości nasion, aby podsuszyć nasiona do poziomu <30 % eRH (Probert, 2003), co w przypadku większości gatunków zapewnia bezpieczne przechowywanie.



Rycina 13 Kosz do suszenia w żelu krzemionkowym. (© RBGK)

TEMAT 3. KONTROLA WILGOTNOŚCI

Podsumowanie autorstwa Robina Proberta (RBGK) w oparciu o prezentację Costantino Bonomi (MTSN), prezentacje PAV-UNI i wynikające z nich dyskusje.

TEMAT 3A. POMIAR WILGOTNOŚCI WZGLĘDNEJ RÓWNOWAŻNEJ

Komentarz ogólny

Opracowanie w ostatniej dekadzie czujników wilgotności względnej równoważnej ukształtowało nowe możliwości efektywnego monitorowania wilgotności na różnych etapach procesu ochrony nasion. Czujniki te są sednem systemów kontroli w komorach suszarniczych i stanowią system ostrzegania przed awariami wyposażenia lub przekroczeniu wymaganych warunków suszenia. Jednak największą zaletą w nowoczesnej technologii ochrony nasion jest rutynowe zastosowanie czujników wilgotności względnej w monitoringu wilgotności nasion (patrz także: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/05-eRH%20moisture%20measurement.pdf>). Mierzy się w ten sposób względną wilgotność powietrza nad próbką nasion. Gdy jest to potrzebne, zmierzoną wilgotność względną równoważną (eRH) można odnieść to zawartości wody w nasionach, odwołując się to izotermie sorpcji wilgotności.

Główną zaletą tych metod, w porównaniu do konwencjonalnego pomiaru zawartości wody, jest ich nieinwazyjność, dzięki której oceniane nasiona nie ulegają zniszczeniu. Ponadto mierzona wartość nie jest zależna od zawartości tłuszczu w nasionach, gdyż nasiona o różnej zawartości tłuszczu suszone w jednakowej wilgotności względnej i temperaturze charakteryzują się różną zawartością wody, ale jednakowym uwodnieniem (potencjałem wodnym).

Jednakże instrumenty do nieinwazyjnego pomiaru wilgotności nasion nie wykluczają zastosowania tradycyjnych metod oznaczania zawartości wody w nasionach. Analiza grawimetryczna zawartości wody w nasionach (patrz: ISTA, 2008) odgrywa wciąż istotną rolę w większości banków nasion, a w połączeniu z wartościami eRH, określonymi na podstawie nakresu poziomów wilgotności w danej temperaturze, jest podstawą do sporządzania izoterm sorpcji wilgotności.

Różne wersje stosunkowo niedrogich, poręcznych i niewielkich urządzeń są obecnie stosowane w bankach nasion do kontroli stanu wilgotności nasion w trakcie i po suszeniu oraz do badań. Jedynie higrometry punktu rosy zapewniają bezpośredni pomiar parametru psychrometrycznego powietrza w stanie równowagi – temperatury punktu rosy (rozważanie na temat właściwości psychrometrycznych powietrza – patrz: Probert, 2003).

Inne higrometry opierają swe pomiary na zmianach fizycznych i chemicznych substancji, odbijających się bezpośrednio w zmianie wilgotności w stosunku do ustalonego standardu. Instrumenty takie to między innymi czujniki higrolityczne, objętościowe i opornościowe. Współczesne higrometry cyfrowe współpracują z oprogramowaniem, które oblicza wymagane jednostki wyjściowe w oparciu o zasady psychrometrii. Dlatego też często spotyka się odczyt w postaci wilgotności względnej (% RH); aktywności wodnej (aw); potencjału wodnego (MPa) i temperatury punktu rosy (°C).

Instrumenty z komorą próbną, zaprojektowane specjalnie do nasion i innych materiałów higroskopowych, mierzą zwykle eRH lub aktywność wodną (tożsama z eRH ale wyrażana w skali od 0 do 1).



Rycina 14 Silica gel hydration series. Stany nawodnienia żelu krzemionkowego. Nawodnienie pełne do częściowego (od lewej do prawej) (© MTSN)

Zalecenia

Higrometry "próbkowe"

Higrometry meteorologiczne (próbkowe) mogą być wykorzystane do pomiaru eRH pod warunkiem, że końcówka pomiarowa czujnika jest szczelna na powietrze i że sam czujnik można umieścić w pasującej "komorze próbki", także przez pokrywkę szczelną wobec powietrza.

Rejestratory samowystarczalne

Miniaturowe rejestratory wilgotności względnej / temperatury mogą być wykorzystane do rejestracji eRH próbek wewnątrz zabezpieczonych pojemników. Instrumenty takie wykorzystuje się na przykład w kontroli zachowania kolekcji nasion podczas przenoszenia pojemników z nasionami z warunków środowiska do temperatury poniżej zera i z powrotem.

Rejestratory są także używane w monitoringu stanu wilgotności kolekcji nasion podczas transportu. Umieszczone pomiędzy nasionami w pojedynczej torebce z dzianiny lub pomiędzy kolekcjami umieszczonymi w pudełkach na czas przesyłki, rejestratory mogą być źródłem istotnych wskazówek wyjaśniających jakość nasion w momencie ich dostarczenia do banku nasion.

Niskokosztowe higrometry mechaniczne i elektroniczne

Mechaniczne i elektroniczne higrometry niewielkich rozmiarów można nabyć za kwoty poniżej 50 euro. Mimo że ich dokładność jest znacznie niższa, instrumenty te mogą być wykorzystane do przybliżonego pomiaru stanu wilgotności nasion. Narzędzia takie, umieszczone pomiędzy kolekcjami nasion podczas wyjazdu na zbiór, mogą wskazywać czy dana kolekcja nie wymaga dalszego podsuszenia. Mogą one ponadto mieć zastosowanie w kontroli warunków środowiska, aby zdecydować, czy są one wystarczające do suszenia nasion a w rezultacie aby potwierdzić fakt wystąpienia procesu suszenia.

Żel krzemionkowy jako wskaźnik wilgotności

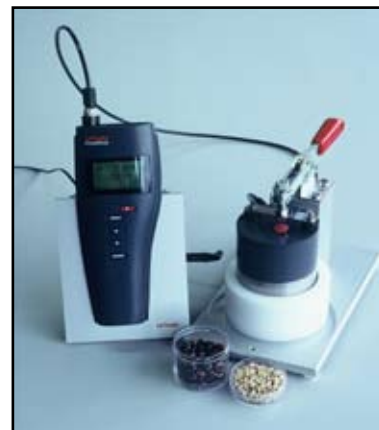
Wykorzystanie żelu krzemionkowego jako surogatu nasion do monitoringu postępu suszenia nasion jest metodą błyskotliwą i bardzo tanią. Krople żelu krzemionkowego umieszczone w porowatych opakowaniach należy umieścić pomiędzy nasionami podczas suszenia. Gdy nasiona wysychają, żel krzemionkowy traci wodę i zmienia kolor.

Priorytety badawcze

W trakcie warsztatów pojawiły się dwie kwestie, które należy wziąć pod uwagę planując dalsze badania. Są to:

Baza danych o zawartości wody w nasionach

Biorąc pod uwagę, iż większość banków nasion rutynowo rejestruje informacje o zawartości wody w nasionach, a także rosnącą liczbę banków wykonujących rutynowe pomiary eRH, przydatne będzie zestawienie obu informacji we wspólnej bazie danych (np. baza danych ENSCONET-u). Ponieważ zawartość wody w danej wilgotności względnej jest dobrym wskaźnikiem zawartości tłuszczu w nasionach, baza taka przyczyniłaby się znacząco do zrozumienia zasięgu taksonomicznego nasion o dużej zawartości tłuszczu.



Rycina 15 Higrometr firmy Rotronic do pomiaru eRH próby nasion. (© Rotronic Instruments (UK) Ltd)



Rycina 16 Rejestrator eRH w zamkniętym pojemniku z nasionami. (© RBGK)



Rycina 17 Różne higrometry mechaniczne i elektroniczne. (© RBGK)

Problemy z suszeniem niektórych gatunków

Zebrane przez RBGK (Millennium Seed Bank) dowody wskazują, że gatunki z niektórych rodzin (takich jak Fabaceae), a zwłaszcza gatunki o względnie dużych nasionach, mogą być odporne na suszenie. Potencjalnym ryzykiem jest to, że kolekcja nasion może być złożona w banku przez całkowitym wysuszeniem. Na problem ten składają się opisane powyżej trudności z uzyskaniem dokładnego pomiaru wilgotności względnej, o ile nasiona nie są rozkruszone.

Niezbędne jest uzyskanie bliższych danych dotyczących zawartości wody i wilgotności względnej równoważnej nasion podczas suszenia w banku nasion, dla przechowywanych rodzin roślin.

TEMAT 3B. WYKORZYSTANIE HIGROMETRÓW DO MONITORINGU WILGOTNOŚCI NASION

Komentarz ogólny

Korzystając z higrometrów do pomiaru wilgotności nasion należy brać pod uwagę możliwość wystąpienia licznych błędów.

Nasiona z nieprzepuszczalną okrywą nasienną

Zaleca się dla zabezpieczenia krojenie lub rozkruszanie przed testowaniem nasion z występującym spoczynkiem fizycznym (m.in. nieprzepuszczalne wobec wody okrywy nasienne, patrz Tabela 1) Aby uniknąć możliwego gwałtownego spadku lub wzrostu zawartości wody w nasionach po odsłonięciu tkanki wewnętrznej, nie należy zapomnieć o jak najszybszym przeniesieniu otwartych nasion do pojemnika na próbki w higrometrze. Oczywistą wadą takiego postępowania jest zniszczenie nasion, w związku z czym nie można uznać testu za "niedestrukcyjny".

Tabela 1. Rodziny zawierające rodzaje o wykazanym spoczynku fizycznym. Patrz także: Baskin, 2003.

Anacardiaceae
Bixaceae (w tym Cochlospermaceae)
Cannaceae
Cistaceae
Convolvulaceae (w tym Cuscutaceae)
Cucurbitaceae
Dipterocarpaceae (podrodziny: Montoideae i Pakaraimoideae ale nie Dipterocarpoideae)
Fabaceae (podrodziny: Caesalpinioideae Mimosoideae oraz Papilionoideae)
Geraniaceae
Malvaceae – (w tym Bombacaceae, Sterculiaceae i Tiliaceae)
Nelumbonaceae
Rhamnaceae
Sapindaceae
Sarcocaulaceae

Wybór komory pomiarowej i rozmiar próbki

Optymalnie należałoby wybrać komorę pomiarową o takiej wielkości, która zapewniłaby jej całkowite wypełnienie przez badane nasiona. Gdy czynnikiem ograniczającym jest wielkość próbki, zaleca się zastosowanie poniższej niepisanej zasady. Komorę pomiarową dobiera się tak, aby masa mierzonych nasion w gramach stanowiła co najmniej 10% całkowitej objętości komory w cm^3 . Na przykład, dla komory o objętości cm^3 masa nasion powinna wynosić minimum 7 g (patrz: Probert *i in.*, 2003).

Pomiar dla próbek nie będących w stanie równowagi

Podczas pomiaru wilgotności względnej równoważnej lub aktywności wodnej nasion nie będących w stanie równowagi (np. nasion w trakcie suszenia) należy koniecznie zapewnić nasionom wystarczająco dużo czasu na osiągnięcie równowagi wykazanej wewnątrz komory pomiarowej higrometru. Zaleca się zdecydowanie rejestrację pomiarów, a przynajmniej okresowe sprawdzanie wartości pomiarowych i ich notowanie, tak aby można było stworzyć wykres równowagi.

Istotność temperatury

Wiemy z izoterm sorpcji wilgotności że wartości równoważne zależą od temperatury (ISTA, 2008). Analogicznie, jeśli zauważa się niezgodność temperatury nasion i temperatury komory pomiarowej higrometru, należy liczyć się z możliwością nieprawidłowego pomiaru. Sytuacja taka może powstać przykładowo wówczas, gdy higrometr oparty na pomiarze aktywności wodnej był wcześniej użyty to zmierzenia stanu wilgotności próbki przechowywanej w banku nasion. Pomiar taki zazwyczaj ma miejsce w temperaturze pokojowej (lub w temperaturze pokoju suchego). Jeśli kolekcja nasion przed pomiarem nie ogrzała się do temperatury pokojowej, lecz była od niej znacząco zimniejsza, wówczas pomiar może być nieprawidłowy. Niezgodność ta może być wyższa lub niższa od wartości poprawnej, zależnie od tego, z jaką szybkością przeniesiono nasiona i od wilgotności względnej otoczenia. Przykładowo, jeśli bardzo zimne nasiona zostaną narażone na kontakt z otwartą przestrzenią, nawet na kilka minut, zachodzi znaczne ryzyko, że cząsteczki wody zostaną zaabsorbowane przez powierzchnię nasion na drodze kondensacji. Taka dodatkowa woda będzie szybko przekazana do atmosfery komory pomiarowej, powodując nieadekwatnie wysoki odczyt wilgotności.

Zaleca się, w przypadku gdy próbka nasion ma być mierzona w temperaturze innej niż temperatura przechowywania, pozostawić odpowiednio dużą ilość czasu, dając próbce możliwość wyrównania temperatury przed jej umieszczeniem w komorze pomiarowej higrometru.

Zalecenia

Zaleca się następujące postępowanie w zakresie kontroli poziomu wilgotności nasion (za: Probert *in.*, 2003):

- Wybrać odpowiednią wielkość kapsuły pomiarowej w celu zminimalizowania pustej przestrzeni ponad próbką nasion.
- Masa próbki [w gramach] nie może być mniejsza niż 10% objętości całkowitej kapsuły [w cm³].
- Jeśli wiadomo, że nasiona okryte są nieprzepuszczalną okrywą nasienną (występowanie spoczynku), należy je przekroić lub rozkruszyć tuż przed umieszczeniem w kapsule pomiarowej.
- Temperaturę próbki nasion należy doprowadzić do pełnej zgodności z temperaturą wewnątrz kapsuły pomiarowej przed początkiem pomiaru.
- Należy pamiętać, że wilgoć uwalnia się przez skórę i oddech z ludzkiego ciała. Konieczne jest zminimalizowanie bezpośredniego, ręcznego przenoszenia nasion, unikanie kontaktu dotykowego wewnętrznej powierzchni kapsuły pomiarowej i oddychania na odkryty czujnik.
- Producenci twierdzą, że do czasu niezbędnego na zrównoważenie temperatury nasion należy podchodzić z ostrożnością. Zalecamy co najmniej 30 minut dla dokładnego pomiaru nasion o stabilnym stanie wilgotności i odpowiednio dłuższy czas, jeśli tkanka wewnętrzna i zewnętrzna mogą mieć różną wilgotność.
- W miarę możliwości, pomiary należy rejestrować, a czas na uzyskanie stanu równowagi powinien być szacowany z danych na wykresie.
- Czujniki należy regularnie kalibrować, zgodnie z wytycznymi producenta

Wiele higrometrów może działać zarówno korzystając z baterii, jak i ze stałego źródła prądu, co umożliwia ich wykorzystanie w terenie. Czujnik pomiarowy można zastosować do pomiaru względnej wilgotności i temperatury otoczenia (jeśli nie jest wbudowany w kapsułę pomiarową), a w momencie zbioru próbki nasiona można umieścić w dobranej wielkością kapsule pomiarowej w celu zmierzenia względnej wilgotności równoważnej nasion.

TEMAT 4. PAKOWANIE

Podsumowanie autorstwa Costantino Bonomi (MTSN) na podstawie prezentacji Cesara Gomeza Campo (UPM), dodatkowych prezentacji RBGK i MAICH, oraz powiązanych dyskusji.

Komentarz ogólny

Odpowiednie pakowanie nasion jest niezwykle istotne dla utrzymania niskiego stanu ich wilgotności, a zatem zapewnienia ich długotrwałej żywotności podczas przechowywania (patrz: Gomez-Campo, 2002). Niskie temperatury stosowane w przechowalnictwie nasion często charakteryzują się wysoką wilgotnością względną, co zwiększa ryzyko przedostawania się wilgoci do pojemników. Nawet, jeśli z powodu niskiej temperatury proces ten postępuje bardzo powoli, po odpowiednio długim czasie, w ostateczności będzie szkodliwy dla nasion. Zapewnienie odpowiedniej zapory wobec pary wodnej jest kluczem do długookresowej ochrony nasion. Jeśli przegapi się ten czynnik, narazi się tym samym na niebezpieczeństwo kolekcje w banku nasion. Bardzo ważne jest więc troskliwe i staranne wybranie wypróbowanych wilgocioodpornych pojemników oraz zastosowanie systemów kontroli.

W związku z powyższym, pierwszym istotnym zagadnieniem jest wybór odpowiednich pojemników odpornych na wilgoć (opis różnych typów pojemników - patrz: Gomez-Campo, 2002 i Manger *i in.*, 2003). Nie ma zbyt wielu materiałów całkowicie odpornych na wilgoć. Nie zaleca się miękkiego plastiku (PET) not być może lepiej nadaje się twardy plastik (PVC), wymaga on jednak dalszych badań. W chwili obecnej, w świetle dostępnych informacji, najlepszym materiałem jest szkło. Wyrażono pewne zaniepokojenie (Gomez-Campo, 2006) dotyczące efektywności bariery dla wilgoci zapewnianej przez torebki foliowe (poliester, aluminium, polietylen) w długim okresie czasu, mimo to są one nadal powszechnie używane w instytucjach ochrony nasion (patrz także: Walters, 2007 i Gomez-Campo, 2009). Jedną z niedogodności jest fakt, że nie mogą być kontrolowane wzrokowo, ponieważ nie są przezroczyste.

W celu kontroli efektywności zabezpieczeń pojemników podczas przechowywania długoterminowego, zaleca się umieszczanie w ich wnętrzu małych saszetek z żel krzemionkowym. Żel ma także dodatkową zaletę wchłaniania etylenu i innych potencjalnie szkodliwych gazów wytwarzanych przez nasiona w procesach katalitycznych podczas starzenia się. Ważne, by saszetki z żel krzemionkowym były odpowiednio dobrane do warunków suszenia przyjętych w banku nasion w celu uniknięcia ryzyka przesuszenia.

Innym ważnym zagadnieniem są zamknięcia pojemników i dostępność do ich zawartości, jeśli korzysta się z pojemników wielokrotnego zamykania i otwierania. Wieko może wymagać okresowego sprawdzania i wymiany. Zaleca się zastosowanie wiek z naturalnej gumy, które pozytywnie przeszły przeprowadzone badania i sprawdziły się w praktyce (dane RBGK). Pojemniki badano regularnie pod względem przemakalności (metodyka patrz niżej) przez różne banki nasion, co jest procedurą zalecaną dla wszystkich banków nasion.



Rycina 18 Sposoby pakowania nasion.
(© NBGB, MAICH, UPM i RBGK).

Wykazano, że nasiona oleiste korzystnie reagują na pakowanie próżniowe, ponieważ tlen zawarty w powietrzu może powodować peroksydację tłuszczu (patrz: Ellis i Hong, 2007). Jednakże pakowanie próżniowe także zwiększa ryzyko wnikania wilgoci ze względu na podciśnienie, a w przypadku owoców o nieregularnym kształcie, ryzyko powstania mikrouszkodzeń. Ponadto nadmierne zgniatanie może potencjalnie zwiększyć naciski na opakowania. Należy pamiętać, że możliwe jest także pakowanie próżniowe nasion w innych pojemnikach, takich jak puszki.

Test przeciekania – procedura

Umieścić 1 g kropli żelu krzemionkowego nasączonego wskaźnikiem fioletem metylowym w 1 l objętości pustego pojemnika (0.1 %, proporcja masy do objętości). Żel krzemionkowy należy wysuszyć w piecu, a pojemnik zrównoważony do warunków pokoju suchego. Umieścić pojemniki testowe w mokrym środowisku (zamknięte pojemniki z wodą) w temperaturze pokojowej na co najmniej 4 tygodnie, a następnie przenieść je do -20 °C na jak najdłuższy możliwy czas. Przynajmniej 10 pojemników w partii powinno zostać poddane testowi, przy czym zaleca się, by test był zaliczony pozytywnie przy 100% skuteczności. Pojedynczy przeciek jest sygnałem, że należy odrzucić całą partię pojemników.

Zalecenia

- Wybrać pojemnik zgodnie z drzewem decyzyjnym z poniższej ryciny.
- Najlepiej pakować nasiona w suchym pokoju lub w innym środowisku o kontrolowanej wilgotności.
- Używać pojemników z przejrzystego szkła (fiolki i butelki z nakrętką, fiolki i słoje z zaciskami sprawdzają się najlepiej w praktyce banków nasion); unikać torebek plastikowych.
- Umieszczać w pojemnikach saszetki z żel krzemionkowym w celu kontrolowania szczelności wiek i ochronie przed katabolitami. Muszą one być dostosowane do warunków suszenia w banku nasion (zazwyczaj 15 % RH).
- Okresowo sprawdzać i wymieniać wieka (jeśli to możliwe).
- Stosować podwójne lub potrójne pakowanie (jak w rosyjskich matryoskach) w celu zwiększenia ochrony przed wnikaniem pary wodnej, zwłaszcza w przypadku kolekcji podstawowych, które powinny przetrwać w stanie nienaruszonym przez lata.
- Stosować partie kontrolne pojemników z wdrożeniem standardowego testu przeciekania (patrz poniżej).

Drzewo decyzyjne do wyboru pojemników

1 Masz przenieść próbki pomiędzy różnymi instytucjami lub z innego powodu przetransportować je na daleki dystans		Użyj torebek foliowych
1 Musisz przechować próbki bez ich przenoszenia na daleki dystans		
	2 Twoim celem jest przechowanie krótkoterminowe	Użyj torebek foliowych lub pojemników szklanych
	2 Twoim celem jest przechowanie długoterminowe	
	3 Potrzebujesz regularnego dostępu do próbki	Użyj przejrzystych pojemników szklanych z możliwością wielokrotnego otwierania z systemem kontroli przesiąkania
	3 Nie potrzebujesz mieć dostępu do próbki	Zastosuj zapieczętowane ognioodporne pojemniki (dla małych kolekcji), podwójnie pakowane pojemniki szklane wielokrotnego otwierania ze wskaźnikowym żel krzemionkowym oraz regularnie kontrolowane lub szczelnie zamknięte torebki foliowe wysokiej jakości, podwójnie pakowane.

Priorytety badawcze

- Być może warto zainteresować wydziały uniwersytetów, zajmujące się badaniem właściwości fizycznych substancji w celu stymulacji badania i testowania wodoodpornych materiałów oraz różnych sposobów zamykania pojemników do przechowywania nasion.
- Uzyskać więcej danych o wpływie pakowania próżniowego na nasiona oleiste.

TEMAT 5. PRZECHOWYWANIE DŁUGOTERMINOWE: TEMPERATURA

Podsumowanie autorstwa M. Eleny González-Benito (UPM) w oparciu o prezentację Hugh Pritcharda (RBGK), dodatkowe prezentacje MAICh i związane z nimi dyskusje.

Komentarz ogólny

Powszechnie wiadomo, że obniżenie zawartości wody w nasionach (patrz temat 1d) i/lub temperatury przechowywania przedłuża żywotność nasion kategorii orthodox (patrz: Roberts i Ellis, 1989; Pritchard i Dickie, 2003). Dlatego też, zaleca się zastosowanie temperatury przechowywania poniżej 0 °C (zazwyczaj pomiędzy -18 i -20 °C) do przechowywania długoterminowego większości nasion kategorii Orthodox (Standardy banków genów FAO, 1994; Rao i in., 2006).

Pamiętając o tym ogólnym zaleceniu, omówimy następujące tematy, interesujące w procesie projektowania banku nasion dla gatunków dziko rosnących, zwłaszcza w przypadku braku publikacji o możliwości przechowywania nasion: (1) temperatura przechowywania nasion; (2) rozpoznanie nasion źle znoszących przechowywanie w -20°C i opracowanie działań przeciwdziałania temu zjawisku; oraz (3) możliwości i zagrożenia kriokonserwacji nasion.

TEMAT 5A. TEMPERATURA PRZECHOWYWANIA

Komentarz ogólny

Korzyści z zastosowania niskiej temperatury oszacowano na podstawie równań żywotności nasion (Ellis i Roberts, 1980). W miarę spadku temperatury przechowywania, wzrasta czas życia nasion. Jednak korzyści obniżania temperatury przechowywania są odpowiednio mniejsze wraz ze spadkiem temperatury (Tompsett, 1986; Dickie i in., 1990; Walters i in., 2004). Decyzja, jaką temperaturę przechowywania zastosować, jest problemem zbilansowania kosztu i wysiłku technologicznego z żywotnością. Większość konwencjonalnych zamrażarek działa w zakresie temperatur od -18 °C do -20 °C, dlatego często stosuje się ten zakres temperatur. W zakresie tym zaleca się przechowywanie nasion o zawartości wody 3,5 – 6,5 % (patrz Temat 2D). Jednak należy pamiętać, że brakuje potwierdzonych danych empirycznych potwierdzających korzyści zastosowania konwencjonalnych temperatur jako optimum równoważącego koszt przechowywania i czas życia nasion. W związku z tym nie zaleca się obniżania temperatury poniżej -35 °C, gdyż nie wpłynie to na trwałość nasion wystarczająco, by zrekompensować podwyższone koszty.

Temperatury tak niskie jak -196 °C, osiągane w kriokonserwacji wykorzystującej jako substancję chłodzącą płynny azot, można zalecić dla krótko żyjących nasion odpornych na podsuszanie (Stanwood, 1985). Postawiono hipotezę, że trwałość nasion wzrasta 175-krotnie w porównaniu z konwencjonalnym przechowywaniem w -20 °C (Dickie i in., 1990; Pritchard i Dickie, 2003). Ostatnio przeprowadzone na osuszonych nasionach sałaty badania wykazały możliwość ich przetrwania w uspieniu przez 500 – 3400 lat w parach ciekłego azotu lub w ciekłym azocie (odpowiednio). Czas ten jest co najmniej 50 razy dłuższy niż w typowych temperaturach przechowywania w bankach nasion (Walters i in., 2004). Kriokonserwację można zalecić także do przechowywania nasion gatunków zagrożonych lub endemicznych, w przypadku których dostępne są jedynie małe ilości nasion, a także dla tkanek (zarodków, osi zarodkowych, stożków wzrostu) nasion kategorii recalcitrant.

Udowodniono, że suche nasiona niektórych gatunków tracą zdolność kiełkowania lub mają krótszą żywotność niż się tego oczekuje po przechowywaniu w temperaturze około -20 °C lub innych temperaturach ujemnych (Ellis i in., 1990; Pritchard i in., 1999). Na przykład, suche nasiona *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae; Pritchard i Seaton, 1993) i *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae; Crane i in., 2003) wykazały niską zdolność kiełkowania po przechowywaniu w -18°C, prawdopodobnie w wyniku transformacji / krystalizacji lipidów. W przypadku *C. carthagenensis*, przywrócono zdolność kiełkowania po ogrzaniu ze względu na zjawisko imbibicji (Crane i in., 2003). Zabiegi niezbędne do przywrócenia zdolności kiełkowania (pod warunkiem, że nie nastąpiło uszkodzenie nasion) mogą być specyficzne dla gatunku i należą do nich: wolniejsza imbibicja, imbibicja w wyższej temperaturze i wstępne ogrzewanie przed imbibicją (patrz: Pritchard i Nadarajan, 2008).

Zalecenia

Do przechowywania długoterminowego nasion większości gatunków orthodox zaleca się zastosowanie temperatur ujemnych (najczęściej pomiędzy -18 i -20 °C).

Nie zaleca się obniżania temperatury poniżej -35 °C w przechowywaniu tradycyjnym, gdyż nie wpłynie to na trwałość nasion wystarczająco, by zrekompensować podwyższone koszty.

Priorytety badawcze

W świetle powyższego, jeśli zdolność kiełkowania gatunku po przechowywaniu w temperaturach ujemnych jest obniżona, nie musi to oznaczać, że nasiona są martwe lub że temperatury ujemne nie są odpowiednie; potrzebne są dalsze badania wyjaśniające sytuację dla poszczególnych gatunków. Jeśli zastosowano wszystkie metody wybudzania ze stanu spoczynku, wskazane może być użycie innej metody imbibicji. Ponadto, można spróbować przechowywania w innych temperaturach.

Wskazane byłoby przeprowadzenie dalszych badań w zakresie efektywności kosztów przechowywania w różnych temperaturach ujemnych.

TEMAT 5B. WYBÓR WYPOSAŻENIA DO PRZECHOWYWANIA W NISKICH TEMPERATURACH

Komentarz ogólny

Chłodnie i chłodziarki

Wybór pomiędzy komorą chłodniczą a chłodziarką stojącą lub skrzyniową zależy od liczby kolekcji i ich objętości (rozmiaru nasion). Jeśli liczby te są małe, wystarczy chłodziarka. Zamrażarki stojące w porównaniu do skrzyniowych ułatwiają dostęp do nasion. Są także bardziej efektywne, ponieważ ilość próbek w przeliczeniu na jednostkę powierzchni podłogi jest większa. Jeśli dokonano już wyboru chłodziarek, zaleca się nabycie zapasowych, pustych zamrażarek, na wypadek awarii sprzętu.

Jeśli objętość przekracza 10-15 m³, wówczas bardziej efektywny jest pokój chłodniczy (Cromarty *i in.*, 1990). W takich przypadkach lepiej mogą się sprawdzać dwa małe pokoje z niezależnymi systemami chłodzenia niż jedno duże pomieszczenie, zwłaszcza jeśli w najbliższej przyszłości nie planuje się całkowitego zapełnienia przestrzeni (patrz także: Linington, 2003 –dyskusja o projektowaniu banku nasion).

Jakikolwiek wybór wyposażenia zostanie dokonany, należy zawsze mieć na uwadze że odpowiedni system etykietowania / kodowania paskowego jest podstawą łatwego i szybkiego wyszukiwania próbek. Jest to szczególnie ważne tam, gdzie drzwi chłodni muszą pozostać otwarte podczas wyszukiwania. Numer kolekcji, numer lokalizacji (np. w UVEG stosuje się zapis: Półka/Stojak/Pojemnik – AB/04/10B) i kod paskowy na etykietce należy zapisać w bazie danych banku nasion.



Rycina 19 Organizacja kolekcji w banku nasion UVEG. (© UVEG)

Próbki podstawowe i aktywne oraz duplikaty

Tradycyjnie, banki nasion dzielą kolekcje na próbki podstawowe, utrzymywane długookresowo w stanie nienaruszalnym oraz próbki aktywne, bardziej dostępne, z których pobiera się nasiona do wykorzystania. Próby podstawowe są zazwyczaj przechowywane w mniej dostępnych opakowaniach (zapięczętowane szkło lub podwójne opakowanie) i w warunkach długoterminowych. Próbki aktywne natomiast przechowuje się w otwieranych pojemnikach (a nawet otwarte w warunkach suchych), w temperaturach bardziej sprzyjających pracy załogi banku nasion. Mogą jednak pojawić się problemy ze zróżnicowaniem genetycznym dwóch próbek (patrz [Temat 9](#)). Ponadto, decyzja o tym, jaka część kolekcji powinna być przeznaczona do dystrybucji, a jaka do długoterminowego przechowywania, bywa trudna. RBGK (Millennium Seed Bank) wydziela próbki podstawowe i aktywne, jednak obydwie są umieszczane w warunkach sprzyjających długookresowemu przechowaniu. Większość nasion stanowi nienaruszalną próbkę podstawową.

Główną zaletą przechowywania nasion w bankach jest to, że w jednym miejscu można utrzymać znaczną część zróżnicowania genetycznego. Taka koncentracja różnorodności to zarazem podstawowa słabość, ponieważ jedno nieprzewidziane zdarzenie może zniszczyć niezwykle cenny (a w niektórych przypadkach nie do zastąpienia) materiał. Dlatego też bardzo ważne jest, poza wysiłkiem wkładanym w bezpieczne przechowanie kolekcji w banku nasion, zduplikowanie próbki w innym banku, położonym odpowiednio daleko.

Kriokonserwacja

Mimo, że przechowywanie w ciekłym azocie ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) lub jego parach (około $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$) może przedłużyć czas życia nasion, ze względów praktycznych / technicznych rzadko jest to podstawowa metoda przechowywania. Analiza ekonomiczna przechowywania w warunkach kriotermicznych w porównaniu z przechowywaniem konwencjonalnym nie pojawiła się w publikacjach od przeszło trzydziestu lat. Byłaby ona bardzo przydatna.

Kriokonserwację można jednak rozważyć w przypadku nasion kategorii orthodox o krótkiej żywotności lub wówczas, gdy dysponujemy małą ilością nasion reprezentujących populację lub gatunek (np. gatunki zagrożone lub endemiczne).



Rycina 20 Kriokonserwacja w ciekłym azocie. (© RBGK)

Mimo iż nasiona wielu gatunków roślin odznaczają się tolerancją na przechowywanie w ciekłym azocie, metoda ta generuje kilka problemów praktycznych:

- Płynny azot jest substancją niebezpieczną, mogącą powodować poparzenia i uduszenia. Niezbędne jest specjalistyczne przeszkolenie załogi, stosowanie odpowiedniej odzieży i procedur bezpieczeństwa. Ze względu na to, że rozlany ciekły azot paruje i gwałtownie wypiera tlen, należy zainstalować alarmy tlenowe w miejscach, gdzie przechowuje się i stosuje płynny azot.
- Odległość do dostawcy ciekłego azotu nie może być duża.
- Duże pojemniki na ciekły azot (np. 600 litrów pojemności na 12,000 kriofiolek) są drogie. Pojemniki należy regularnie napełniać do wymaganego poziomu, aby utrzymać próbki w odpowiedniej temperaturze (ok. -150 °C). Małe pojemniki kriogeniczne (np. 30 litrów, o maksymalnej pojemności 855 fiolek po 2 ml każda) można napełniać ręcznie; jednak większe wymagają zastosowania dodatkowego pojemnika. Pomimo kosztu początkowy dużych pojemników jest wysoki, cena uzupełniających dawek ciekłego azotu jest niższa w porównaniu z utrzymaniem małych pojemników, ponieważ transport ciekłego azotu zwiększa koszty.
- Metoda nadaje się jedynie do stosunkowo małych partii nasion w kolekcji.
- Należy rozważyć trzy główne zagadnienia umożliwiające maksymalne wydłużenie czasu przechowywania nasion: (Pritchard i Nadarajan, 2008): 1) zawartość wody w nasionach powinna być niższa niż granica poziomu wilgotności umożliwiającego zamrażanie (Stanwood, 1985) ; 2) szybkie zamrażanie lub ocieplanie może powodować mechaniczne uszkodzenia silnie osuszonych nasion, można tego jednak uniknąć; 3) powolna imbibicja, a zwłaszcza unikanie zanurzenia w wodzie w nieodpowiednich temperaturach, są zalecane przed lub jako element testu kiełkowania.

Poza zaletą przedłużenia czasu życia nasion w kriokonserwacji, należy zauważyć także, iż kriopojemniki mają trwałość mniej więcej pięciokrotnie dłuższą niż chłodziarki (J. Puchalski, komentarz ustny) i nie wymagają okresowych dostaw energii.

Zalecenia

W przypadku bardzo krótkotrwałych nasion kategorii orthodox, można zalecać kriokonserwację w ciekłym azocie lub jego parach.

Każda próbka musi być zduplikowana w drugim banku. Bank ten powinien być odpowiednio oddalony, tak aby nie był narażony na te same czynniki katastrofalne, mogące zniszczyć główny zasób.

Priorytety badawcze

Wskazane jest sporządzenie analizy efektywności kosztów kriokonserwacji w zestawieniu z przechowywaniem tradycyjnym.

TEMAT 6. PODSTAWOWE TESTY KIEŁKOWANIA

Podsumowanie autorstwa Davida Drapera and M. Eleny González-Benito (UPM) na podstawie prezentacji Costasa Thanosa (NKUA), innych prezentacji PAV-UNI i RBGK oraz wynikającym z nich dyskusji.

Komentarz ogólny

Bardzo istotne dla banku nasion jest rozpoznanie żywotności przechowywanych nasion. Żywotność nasion definiuje się jako liczbę nasion żywych w partii, które mają potencjał wytworzenia siewki (Gosling, 2003; Rao *i in.*, 2006).

Ponieważ trwałość partii nasion zależy od ich jakości, bardzo ważne jest, by nasiona miały wysoką żywotność, a przynajmniej, aby ich żywotność była znana. Najbardziej godną zaufania metodą sprawdzania żywotności jest próba kiełkowania, czyli kiełkowanie nasion w warunkach optymalnych w razie konieczności po przełamaniu stanu spoczynku. Problem pojawia się jednak kiedy optymalne warunki kiełkowania i metody przełamania spoczynku nie są znane, co zjawia się często w przypadku gatunków dziko rosnących.

Można zastosować również znane testy biochemiczne (np. Tetrazolium, TTC), które umożliwiają identyfikację nasion żywotnych bez kiełkowania. Testy takie bywają przydatne dla odróżnienia nasion nieżywotnych od uśpionych. Ich wadą jest jednak mniejsza dokładność w porównaniu do próby kiełkowania oraz fakt, iż czasami ich rezultat bywa trudny do interpretacji.

Oczywiście znajomość techniki kiełkowania nasion jest ważna, tak aby móc ją wykorzystać w przyszłości. Dlatego też skupimy się tutaj na próbie kiełkowania i procedurach prowadzących do produkcji normalnych siewek.

Zalecenia

Kiedy testować?

Najlepiej jeśli próba kiełkowania może być przeprowadzona przed i po suszeniu oraz po przechowywaniu w celu sprawdzenia, czy suszenie i zamrażanie wpływa na jej wynik. W wielu bankach nasion jest to jednak trudne do zrealizowania. Wskazane jest przeprowadzanie próby kiełkowania na jak największej możliwej ilości zasobów po osuszeniu i procesach technologicznych nasion, jeśli to możliwe, po suszeniu i procesach technologicznych ale przed złożeniem w banku nasion i po przechowywaniu. Jeśli ilość nasion jest ograniczona i można przeprowadzić jedynie test wstępny, zaleca się by był on wykonany w ciągu pierwszego miesiąca przechowywania. Wynik testu będzie wytyczał potrzebę wykonania przyszłych ocen.

Ile nasion testować?

Przed przeprowadzeniem próby kiełkowania, należy oszacować ilość nasion pustych i uszkodzonych (o ile nie zrobiono tego wcześniej, podczas oczyszczania lub zbioru). Wynik należy wyrazić jako ilość nasion, które mogą być fizycznie zdolne do wykiełkowania (całkowita liczba nasion – nasiona uszkodzone lub puste).

Zalecana próbka 200 nasion (dwa powtórzenia po 100), stosowana dla nasion roślin uprawnych (FAO / IPGRI, 1994; ISTA, 2005), może być zbyt duża dla gatunków dziko rosnących, z ograniczoną liczebnością próby. Bywa tak zwłaszcza w przypadku gatunków zagrożonych o małych populacjach lub



Rycina 21 Wyniki testu kiełkowania. (© RBGK)

gatunków wytwarzających duże nasiona. W tych przypadkach, najlepsze będą dwa powtórzenia po 50 lub 25 nasion (proszę zauważyć, że nie są to jednoznaczne wskazania, niektóre banki, np. MAICh, stosują 3 powtórzenia po 30 nasion). Zalecenie to bywa szczególnie przydatne dla banków przechowujących wiele kolekcji i o ograniczonej ilości personelu lub małej dostępności do zasobów.

Nawilżanie nasion suchych

Przed wyjęciem nasion, pojemniki z nasionami należy ogrzać (patrz **Temat 10**). Nasiona narażone na uszkodzenia od imbibicji, jak na przykład duże nasiona Leguminosae (Fabaceae), należy nawilżyć po wyjęciu z chłodni. Zapobiega to uszkodzeniom od imbibicji, czyli zniszczeniu dużych lub starych nasion spowodowanemu gwałtownemu wnikanu wody, które powoduje wyciek zawartości komórek przez błony komórkowe, nie mające możliwości odbudowania zniszczeń. W tym celu nasiona można umieścić w plastikowym pojemniku z hermetycznym zamknięciem (podobnie jak pojemniki do przechowywania żywności) lub w suszarkach zawierających pojemnik z wodą; woda ta zapewnia wilgotne środowisko. Nasiona pozostawia się w pojemniku na 24 godziny przed wysiewem, nie mogą jednak wejść w bezpośredni kontakt z wodą w fazie ciekłej.

Wybór warunków kiełkowania

Zdolność kiełkowania jest cechą niezwykle plastyczną, a wymagania nasion mogą wykazywać znaczne różnice dla różnych gatunków, populacji, lat zbioru, a nawet okresów przechowywania. Jednakże, w świetle opublikowanej literatury oraz baz danych, np. bazy danych Kew (Liu *et al.*, 2008: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>), wymagania odnośnie kiełkowania danego lub spokrewnionego z nim gatunku mogą być istotną wskazówką, a w niektórych przypadkach trendy na poziomie rodzaju, a nawet rodziny (np. wymagania świetlne rodziny Campanulaceae).

Jeśli nie posiadamy odpowiednich danych (co zdarza się często), wymagania kiełkowania można oszacować na podstawie danych o ekologii (siedlisko i preferencje klimatyczne) i strukturze nasion gatunku. Na przykład, nasiona o rozwiniętym bielmie i małym zarodku (co wskazuje na prawdopodobne wypoczywanie spoczynku morfologicznego), pochodzące z obszarów z mroźną zimą i/lub upalnym, suchym latem (prawdopodobny spoczynek fizjologiczny), prawdopodobnie zapadają w spoczynek fizjologiczny, a w związku z tym wymagają przedłużonej inkubacji w warunkach naśladujących okres, w którym kiełkują w naturze.

Przełamywanie spoczynku

Nasiona po umieszczeniu w warunkach optymalnych dla kiełkowania mogą nie kiełkować mimo, iż są żywotne, ponieważ znajdują się w stanie spoczynku. Spoczynek może być spowodowany cechami zarodka lub okrywy nasiennej (patrz: Finch-Savage i Leubner-Metzger, 2006). Nasiona wielu dziko rosnących gatunków wykazują spoczynek.

Niektóre z powodów spoczynku nasion (patrz: Baskin i Baskin, 1998):

- *Niepełny rozwój zarodka.* Zdarza się to zazwyczaj w przypadku nasion o małym zarodku i obfitym bielmie. W takim typie nasion (ze spoczynkiem morfologicznym) zarodek musi urosnąć, aby nasiono było zdolne do kiełkowania (Baskin *i in.*, 2006). Zazwyczaj niezbędna jest stratyfikacja na ciepło lub zimno, dostosowana do okresu naturalnego rozsiewu nasion (np. wiosna lub jesień). Jeśli jednak niewykształcony zarodek nie rozpoczyna wzrostu niezwłocznie po rozsianiu nasion, może on być również w spoczynku fizjologicznym. Wówczas (spoczynek morfo-fizjologiczny) najpierw należy poddać nasiona stratyfikacji zimnej lub ciepłej, a dopiero później można oczekiwać rozwoju zarodka.

- *Twarda (nieprzepuszczająca wody) okrywa nasienna / owocnia.* Zdarza się to u licznych gatunków z rodzin: Anacardiaceae, Bixaceae, Cistaceae, Combretaceae, Convolvulaceae, Curcubitaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Malvaceae, Rhamnaceae, Rutaceae, Sapindaceae i Violaceae. Skaryfikacja mechaniczna (poprzez kruszenie, otwieranie lub ścieranie papierem

ściernym) lub termiczna (poprzez zanurzenie w gorącej wodzie) okrywy nasiennej przed kiełkowaniem umożliwia nasionom pobór wody. Tradycyjnie, trzecim sposobem jest skaryfikacja chemiczna, nie zaleca się jej jednak ze względu na potencjalną szkodliwość i konieczność dokładnej kalibracji parametrów tego zabiegu. Spośród wymienionych metod, w przypadku małych partii nasion zaleca się ostrożne ręczne kruszenie lub otwieranie.

- Nasiona zawierają *inhibitory kiełkowania*, które mogą znajdować się w zarodku bądź okrywie nasiennej. Spoczynek można przełamać stosując stratyfikację (zimną lub ciepłą), płukanie w bieżącej wodzie lub aplikację GA_3 .

Warunki kiełkowania: woda/agar, temperatura, światło

Podłożem do wysiewu może być agar, bibuła lub piasek. 2 pierwsze stosuje się wewnątrz szalek Petriego, natomiast trzecie podłoże ma zwykle zastosowanie w przypadku dużych nasion (Rao *i in.*, 2006) w ramach lub większych naczyniach plastikowych. Jakość bibuły powinna być wysoka. Podłoże musi być ujednolicone, aby umożliwić powtarzalność uzyskanych wyników.

Agar (zwykle 1 %) ma, w porównaniu do papieru, następujące zalety:

- Łatwiejsze utrzymanie (nie wymaga regularnego podlewania), dlatego wyniki są mniej zróżnicowane
- Niższe narażenie na uszkodzenia przez imbibicję
- Stałe stężenie zastosowanych substancji chemicznych (świeży agar po 3 tygodniach)
- Białe kiełki są dobrze widoczne na ciemnym podłożu
- Siewki można usuwać w celu przesadzania.

Jeśli jednak próba kiełkowania trwa ponad 4 tygodnie, agar może zacząć wysychać. Należy ponadto wziąć pod uwagę, że niektóre nasiona mogą wymagać powierzchniowej sterylizacji przed wysiewem. Nasiona można poddać sterylizacji powierzchniowej poprzez zanurzenie w 10% roztworze domowego wybielacza, a następnie dokładne opłukanie w zdejonizowanej wodzie.

Zawsze należy stosować wodę zdejonizowaną lub destylowaną. W przypadku bibuły, objętość wody zależy od gęstości bibuły, nie powinna ona być tak mokra, by po naciśnięciu palcem wytwarzała się wokół niego warstewka wody (Rao *i in.*, 2006).

Nasiona należy równomiernie rozłożyć na powierzchni tak, by się nie stykały. Następnie pojemniki umieszcza się w kiełkownikach. Wilgotność substratu należy kontrolować, zwłaszcza w wysokich temperaturach (25-30 °C). Jeśli stosuje się bibułę, wodę należy regularnie uzupełniać (co 2-3 dni).



Rycina 22 Nacinanie skalpelem twardej okrywy nasiennej. (© RBGK)



Rycina 23. Inkubator naśladujący warunki świetlne dnia i nocy. (© RBGK)

Warunki inkubacji, w miarę możliwości, powinny naśladować warunki otoczenia naturalnego w okresie kiełkowania. Dlatego też zaleca się raczej kiełkowanie nasion w zmiennych temperaturach dziennych i zmieniając oświetlenie zależnie od pory dnia (Baskin i in., 2006). W miarę możliwości należy unikać temperatur stałych, poza większością stosowanych procedur stratyfikacji. Należy unikać stałego światła, gdyż może ono działać jak inhibitor kiełkowania (HIR – reakcja na przeświecenie). Gatunki śródziemnomorskie zazwyczaj mają niskie optimum temperatury kiełkowania (10-20 °C), a w wielu przypadkach sprawdza się zmienność temperatur w zakresie 10/20 °C lub 15/20 °C (ciemność/światło). Gatunki subtropikalne, tropikalne i alpejskie kiełkują zwykle najlepiej w wyższych temperaturach (20-25 °C). Stosuje się zwykle fotoperiod 8, 12 lub 16 godzin. W przypadku niektórych gatunków alpejskich i klimatu umiarkowanego kiełkowanie nasion wzmagają zastosowanie okresu zimnej stratyfikacji (to znaczy 0 °C przez 4-20 tygodni).

Mimo, że preferowanie przez nasiona ciemności jako optimum warunków do kiełkowania nie jest częstym zjawiskiem, zawsze należy pamiętać o takiej możliwości. Prawdopodobieństwo, że gatunek preferuje brak światła wzrasta w przypadku nasion dużych i odnotowano ją u niektórych przedstawicieli Cucurbitaceae. Także *Galanthus nivalis* lepiej kiełkuje w ciemności.

Zalecane źródła wiedzy na temat warunków kiełkowania i przełamывania spoczynku: Ellis i in., 1995 oraz Seed Information Database (Liu et al., 2008: <http://kew.org/data/sid/>).

Zależnie od liczby prób do kiełkowania i dostępnego personelu, nasiona kiełkowane regularnie kontrolować i notować wyniki – przynajmniej 1 raz w tygodniu. Jeśli nasiona można sprawdzać co 1-2 dni, da się określić dokładny wskaźnik (tempo) kiełkowania. Czas trwania testu zależy od gatunku.

Zapis wyników kiełkowania

Na potrzeby testów kiełkowania, nasiono skiełkowane można zdefiniować jako nasiono z wystającym kiełkiem długości 1-2 mm lub przynajmniej długości samego nasiona. Ważne, aby przed początkiem kontroli kiełkowania znać dokładną definicję tego procesu. Nasiona skiełkowane usuwa się i liczy na każdej podstawce. Należy koniecznie usuwać nasiona zainfekowane, aby zapobiec rozprzestrzenianiu się infekcji (Rao i in., 2006), fakt taki trzeba jednak odnotować. Można ewentualnie powierzchniowo odkazić i wysiać ponownie nasiona o małym stopniu infekcji. Okres rejestrowania wyników kiełkowania nasion różni się pomiędzy gatunkami i może trwać od 1 tygodnia do kilku miesięcy. Typowy czas dla większości gatunków dzikiej flory to 4- 6 tygodni. Ilość nasion skiełkowanych notuje się na arkuszu danych. Należy odnotowywać na nim również inne spostrzeżenia, takie jak liczba nasion zainfekowanych i nietypowe kiełkowanie.

Pod koniec próby kiełkowania, nasiona nieskiełkowane poddaje się próbie krojenia w celu określenia liczby nasion: pełnych, silnych i świeżo wyglądających (nasiona prawdopodobnie spoczynkowe), spleśniałych i miękkich (martwe) oraz pustych. Średni wskaźnik procentowy kiełkowania oblicza się z wyników we wszystkich powtórzeniach, biorąc pod uwagę nasiona puste i uszkodzone. Jeśli nasiona poddane kiełkowaniu sprawdzano często (co 1-2 dni), można obliczyć także tempo kiełkowania. Przykładowo, T_{50} to indeks kiełkowania definiowany poprzez czas niezbędny do wykiełkowania połowy (50 %) wszystkich skiełkowanych w określonych warunkach nasion.

Wyniki próby kiełkowania (procent skiełkowanych nasion i tempo kiełkowania) należy wprowadzić do bazy danych banku nasion wraz z opisem zastosowanych procesów technologicznych i warunków kiełkowania.

Priorytety badawcze

Przydatna będzie ocena korelacji pojawiania się kiełków z normalną produkcją siewek w naturze. Zależność pomiędzy tymi dwoma „formami” wzrostu daje odniesienie do zaleceń testowania kiełkowania nasion ISTA. Przydatne będą także zdjęcia siewek.

TEMAT 7. WERYFIKACJA I OKAZY ZIELNIKOWE

Podsumowanie autorstwa Simona Liningtona (RBGK) na podstawie prezentacji Gianniego Bedini (Pisa Botanic Garden) i dyskusji.

Komentarz ogólny

Znajomość poprawnej nazwy naukowej gatunku reprezentowanego przez kolekcję jest niezwykle istotna. Prawidłowa nazwa jest połączeniem pomiędzy kolekcją a dostępnym zasobem wiedzy o gatunku. Jest również gwarancją, że użytkownicy nasion nie tracą czasu pracując nad złym materiałem (Goldblatt *i in.*, 1992) i publikując błędne wyniki. Zielnik jest podstawą wyjaśniania nieoczekiwanych wyników (Funk *i in.*, 2005).

Zdarza się, że populacja jest tak dobrze znana lub zbieracz jest takim znawcą gatunku, że można przyjąć bez wahania rozpoznanie dokonane w terenie. Częściej jednak zbiera się jeden lub dwa okazy zielnikowe (patrz: Bridson i Forman, 1998 – technika i dodatkowe informacje). Powinny one reprezentować te rośliny z populacji, z których dokonano zbioru nasion i są przechowywane w celu potwierdzenia rozpoznania gatunku poprzez odniesienie do oznaczonych okazów zielnikowych. Zazwyczaj okaz (określany jako 'voucher') jest pozyskany wraz z nasionami. Jednak nie zawsze stan fenologiczny rośliny w tym czasie umożliwia jej weryfikację. W związku z tym, zdarza się, że sytuację tę trzeba przewidzieć i zebrać okazy zielnikowe wcześniej niż nasiona.

RBGK (Millennium Seed Bank Project) radzi, by dla zduplikowanych kolekcji okazy zielnikowe gatunków drzewiastych pozyskiwać z tego samego osobnika, reprezentującego przeciętne cechy populacji, z którego pozyskano także część nasion; ujednolica to zduplikowany materiał przechowywany przez wszystkie herbaria. Jest jednak kwestią dyskusyjną, czy każdy ze zduplikowanych okazów nie powinien być pozyskany z innego osobnika i odpowiednio opisany, gdyż mogłoby to umożliwić przegląd w różnicowanie morfologiczne lub genetyczne populacji.



Rycina 24 Okaz zielnikowy.
(© RBGK)

Doświadczony botanik może dokonać weryfikacji w terenie lub później, w herbarium. Najczęściej wykorzystuje się do tego celu klucze botaniczne. Należy zapisać zarówno nazwisko botanika dokonującego weryfikacji, jak i wszelki zmiany w rozpoznaniu okazu.

Bridson i Forman (1998) – szczegółowe informacje o opiece nad zielnikiem.

Istotną kwestią jest, by bank nasion otrzymywał informacje o zmianach nomenklatury taksonomicznej dotyczącej posiadanych okazów zielnikowych. Dlatego też, okaz zielnikowy powinien w swoim opisie zawierać wzmiankę o tym, że jest powiązany z kolekcją w banku nasion.

Zalecenia

Z wyjątkiem nielicznych przypadków, gdy populacje są dobrze znane, należy zebrać sprasowane okazy roślin reprezentujących populację, z której pobrano nasiona. Oczywiście w przypadku populacji zagrożonych i rzadkich, zbiór powinien być wykonany ostrożnie. Przydatne są także zdjęcia roślin.

TEMAT 8. DANE

Podsumowanie autorstwa Simona Liningtona (RBGK) w oparciu o prezentację Gianni Bedini (Pisa Botanic Garden) i dyskusje.

Komentarz ogólny

Kolekcje nie posiadające dobrych danych są niemal bezużyteczne. Podczas zapisu danych dotyczących kolekcji nasion nie można zapomnieć, że mają one być przydatne dla użytkowników obecnie i w trakcie całego okresu przechowywania nasion (być może 200 lat). W związku z tym dane muszą być obiektywne. Ich gromadzenie musi być zunifikowaną procedurą. Można to osiągnąć stosując standardy danych. ENSCONET opublikował standardy danych (patrz: schemat, 2009). Standardy te należy przechowywać wraz z danymi.

Dane dotyczące zbioru (patrz: Podręcznik zbioru nasion ENSCONET) zapisuje się w terenie. Dane dotyczące zarządzania kolekcją łączy się z danymi ze zbioru w trakcie dalszych prac nad nasionami i okazami zielnikowymi. Jeśli struktura danych jest dobra, mogą one umożliwić prześledzenie procesów technologicznych materiału. Ważne jest także zapisywanie danych na temat wykorzystania kolekcji.

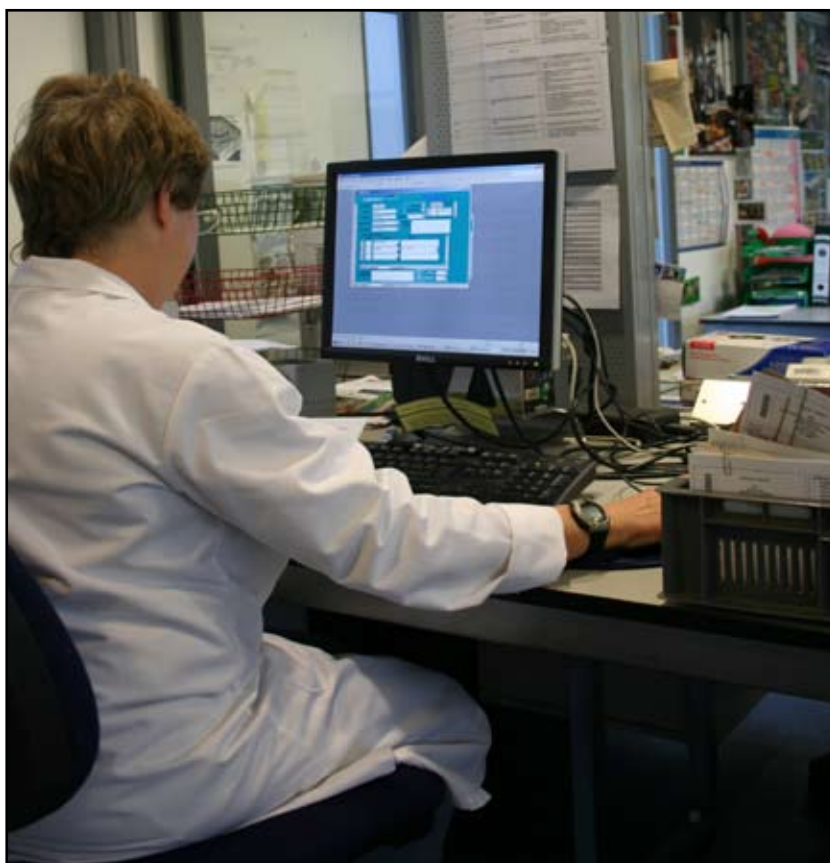
Tak jak w przypadku wszystkich baz danych, ważna jest składnia, a więc zasady wprowadzania danych. Tak więc, należy umożliwić automatyczne sprawdzanie prawidłowości wprowadzania danych, np. uniemożliwienie wprowadzania dat przyszłych, miesiąc ≤ 12 itd.

Dane dotyczące postępowania w banku nasion można pogrupować (dla przykładu patrz: Bone *i in.*, 2003):

- Czyszczenie
- Suszenie
- Pakowanie
- Przechowywanie
- Weryfikacja
- Dystrybucja

Szczegóły konkretnych pól i standardu ich wypełniania przedstawiono w schemacie danych ENSCONET (2009). Pola z informacją dodatkową (uwagi) można wykorzystać do zapisu różnych wersji procedury, należy jednak pamiętać, że istnieje niebezpieczeństwo, że nie danych tych nie będzie można wyszukać.

W miarę możliwości, należy stosować Międzynarodowy Format Transferu opracowany przez BCGI. Zapewni to dobrą wymianę danych i zmniejszy konieczność opracowywania danych na nowo w momencie ich przesyłu do wspólnych baz danych.



Rycina 25 Dobre zarządzanie danymi to podstawa.
(© RBGK)

TEMAT 9. REGENERACJA NASION

Podsumowanie autorstwa Alberta-Dietera Stevens (BGBM) na podstawie prezentacji of Simona Liningtona (RBGK) i dyskusji.

Komentarz ogólny

Definicja i cel

Regeneracja nasion to wytworzenie nowej partii nasion w przypadku, gdy do ustalonego poziomu spada żywotność lub liczba nasion w starej kolekcji. W przypadku straty liczby nasion mówi się często o “pomnożeniu nasion”.

Istotnym elementem odtwarzania nasion jest utrzymanie spójności genetycznej próbki oryginalnej. Dwa zagadnienia to zachowanie występowania różnych alleli oraz, w miarę możliwości, zachowanie częstości występowania tych alleli. Zabieg ten jest kosztowny i trudny do prawidłowego przeprowadzenia, dlatego też najlepiej unikać go poprzez zbiór dużej ilości nasion o dobrej jakości. W niektórych przypadkach lepiej zebrać nasiona ponownie z naturalnego stanowiska (o ile jest to nadal możliwe) niż prowadzić ich odtwarzanie.

Poziom żywotności, przy którym kolekcja nasion powinna zostać odtworzona, to tzw. „standard odtwarzania”. Zazwyczaj przyjmuje się wysoki poziom żywotności (75-85 %) by nie dopuścić do uszkodzenia genetycznego, związanego ze spadkiem żywotności i aby nie dopuścić do pogorszenia udatności w terenie. Biorąc pod uwagę, że żywotność nasion kontroluje się zwykle co 5 do 10 lat próbą kiełkowania, ważne jest aby najpierw przerwać spoczynek nasion. Błąd statystyczny przy zbliżaniu się do poziomu standardu odtwarzania utrudnia określenie, czy żywotność nasion nadal jest wyższa od standardu. Można zastosować procedurę zwaną “testowaniem sekwencyjnym”, podczas której zwiększa się próbkę aż do wielkości, na której można określić żywotność nasion z wliczonym ryzykiem błędu statystycznego (patrz: Ellis, Hong i Roberts, 1985). Ponieważ jednak proces ten wymaga zaangażowania, w większości banków nasion zabezpiecza się nasiona błędnie przed wczesne odtwarzanie lub podejmuje się ryzyko zbyt późnego odtworzenia. Należy wziąć pod uwagę, że uprawa terenowa może mieć znacznie mniejszą udatność niż laboratoryjna próba kiełkowania. Dlatego też nie można o tym zapomnieć planując ilość roślin na uprawie.



Rycina 26 Regeneracja *Bromus bromoideus* (gatunku wymarłego na stanowiskach naturalnych). (© RBGK)

Pomnażanie nasion przeprowadza się, gdy w terenie pozyskano małą liczbę nasion (np. w wypadku małych populacji zagrożonych gatunków) lub gdy ilość nasion podczas przechowywania spadła do określonego poziomu. Poziom ten należy ustalić tak, aby pozostała wystarczająca ilość nasion do przeprowadzenia kilku (załóżmy, że trzech) prób odtworzenia (można założyć 500-1000 żywych nasion). Optimum (rzadko występujące w praktyce) to sytuacja, gdy użytkowanie kolekcji prowadzi do jednoczesnego wystąpienia poziomu standardu odtwarzania i zapotrzebowania na odtworzenie ze względu na spadek ilości nasion. Liczba nasion w przechowywaniu obniża się z dwóch powodów. Po pierwsze, nasiona zużywa się do kontroli stanu kolekcji. Spadek ich ilości jest przewidywalny w oparciu o częstotliwość monitoringu i wielkości próbek. Po drugie, nasiona przekazuje się różnorodnym użytkownikom do celów naukowych i ochroniarskich. Tego spadku nasion raczej nie można przewidzieć; niektóre kolekcje okazują się bardzo „popularne”, a inne rzadko użytkowane. Wiele banków rozbija kolekcję na zasób główny (ochrona) i próbki aktywne (dystrybucja). W ten sposób, zasób podstawowy nie jest użytkowany, a próbki aktywne wykorzystuje się do dystrybucji. W większości banków, kolekcja aktywna przechowywana jest w warunkach krótkoterminowych, w przeciwieństwie do zasobu głównego. W innych (np. RBGK), obie przechowuje się w podobnych warunkach długoterminowo. W przypadku próbek bardzo „popularnych”, liczba nasion w kolekcji aktywnej może gwałtownie spadać. Dlatego też próbkę aktywną należy pomnażać, aby utworzyć świeżą próbę. Istnieje niebezpieczeństwo, że jeśli robi się to zbyt często (zwłaszcza na stanowisku odległym od stanowiska zbioru), kolekcja aktywna może różnić się genetycznie od zasobu podstawowego. Dlatego też okresowo należy usuwać próbki z zasobu podstawowego, aby odnowić z nich kolekcję aktywną.

Zasoby o niskiej żywotności mają pierwszeństwo odtwarzania przed zasobami o małej ilości nasion.

Zagrożenia

Odtwarzanie nasion niesie ze sobą zagrożenie spójności genetycznej kolekcji nasion ze względu na selekcję, dryf genetyczny (losową utratę rzadszych alleli w małych próbkach) lub hybrydyzację z pokrewnym materiałem (zwłaszcza tego samego gatunku) hodowanym w pobliżu (patrz: Breese 1989 – szczegółowa dyskusja zagadnienia). Pracownicy banku nasion powinni dołożyć wszelkich starań, aby zredukować te zagrożenia, należy jednak pogodzić się z faktem, że nie uda się ich całkowicie wyeliminować.

Hybrydyzacja jest głównym zagrożeniem w przypadku gatunków krzyżujących się. Należy zauważyć, że wiele gatunków nie krzyżujących się krewniaczo wykazuje niski poziom krzyżowania zewnętrznego; poziom ten może wzrastać w określonych warunkach środowiska. Także niektóre z gatunków apomiktycznych warunkowo mogą się krzyżować. Selekcja przybiera różne formy. Najbardziej oczywista z nich jest spowodowana wzrostem materiału w warunkach różnych od warunków naturalnych. Jej przyczyną są różnice klimatyczne i glebowe (w tym mikrobiologiczne) w porównaniu do stanowiska naturalnego. W hodowli materiał może być poddany działaniu czynników selekcyjnych powodowanych przez szkodniki i choroby, jakich nie doznał wcześniej. Może także wystąpić efekt współzawodnictwa gdy rośliny hodowane są w większym zagęszczeniu niż w naturze. Opiekunowie kolekcji muszą mieć świadomość, że typowe praktyki ogrodnicze zakładają pielenie chwastów i usuwanie roślin osłabionych; należy poinstruować personel by tego unikano.

Dalsza selekcja może być wynikiem różnic w okresie i wielkości produkcji kwiatów, pyłku i nasion. Efekty te można ograniczyć przez wyrównanie liczby nasion pozyskanych z każdej rośliny macierzystej.

O ile część kolekcji nie jest zabezpieczona osobno, istnieje także ryzyko jej całkowitej utraty pod wpływem niekorzystnych czynników środowiska. Należy oczywiście zrównoważyć podział kolekcji ze względów bezpieczeństwa i stworzenie wąskiego gardła poprzez odtwarzanie próbek dużo mniejszych niż pierwotny zbiór w terenie (allele nie są przenoszone bezpośrednio na następne pokolenie lub pojawia się chów wsobny u gatunków krzyżujących się niekrewniaczo).

Kolejnym zagrożeniem jest wymieszanie nasion po zbiorze z innymi, podobnymi morfologicznie. Zagrożenie to nie powinno być większe niż inne okoliczności zbioru i przetwarzania, pod warunkiem że nie zapomina się o zdrowym rozsądku.

Genetyczne aspekty odtwarzania

Celem odtwarzania jest uzyskanie całkowicie losowego kojarzenia pomiędzy stałą liczbą rodziców w każdym pokoleniu i wyrównanie efektu reprodukcyjnego roślin rodzicielskich (patrz: Breese 1989). W warunkach naturalnych, nie wszystkie rośliny w populacji przyczyniają się na równi do wytworzenia kolejnego pokolenia z wielu powodów i dlatego pojedyncze próbki pozyskane w terenie rzadko w pełni reprezentują obecne zróżnicowanie genetyczne populacji.

W przypadku odtwarzania chcemy zminimalizować utratę zróżnicowania genetycznego tak aby próbki pozyskane ze stanowisk naturalnych nie różniły się genetycznie od próbek pochodzących z pierwszego, drugiego i kolejnych odtwarzań. Optymalnie, odtwarzanie należałoby przeprowadzać tak rzadko jak to możliwe, z wykorzystaniem jak największej liczby osobników. Z takim założeniem, należy liczyć się z tym, że jedno „wąskie gardło” może doprowadzić do znacznego spadku różnorodności. Przykładowo, jeśli 50 osobników zostanie zebranych w naturze, wówczas co najmniej 50 z nich należy wykorzystać do odtwarzania. Jeśli do następnego odtwarzania wykorzysta się co najmniej 10 osobników, można utracić znaczną część zróżnicowania. Nawet jeśli kolejne odtwarzania wykorzystają 50 osobników, odczuwalny będzie nadal silny wpływ wąskiego gardła. Losowy wybór nasion do wyhodowania roślin może okazać się nie dość losowy. Na przykład, przypadkowo 10 lub 50 roślin może pochodzić z rośliny zebranej w naturze. Problemu tego unikniemy przechowując osobno nasiona zebrane z poszczególnych osobników (patrz niżej).

Należy koniecznie wziąć pod uwagę system rozmnażania gatunku. System rozmnażania to “wszystkie czynniki z wyjątkiem mutacji, wpływające na stopień podobieństwa genetycznego gamet łączących się podczas zapłodnienia” (Thain i Hickman, 2000 – patrz także [Załącznik 1](#)). Nie można jednak zapomnieć, że system rozmnażania może się różnić pomiędzy populacjami tego samego gatunku (nie wszystkie gatunki wykazują tylko jeden system rozmnażania), a u wielu gatunków znane są systemy niezgodne, gdzie następuje rozłam pod koniec okresu kwitnienia.

Taksony zawsze krzyżujące się krewniaczo (np. gatunki o zamkniętych kwiatach kleistogamicznych) i taksony apomiktyczne nie wymagają kontrolowanego zapylenia. Jednak należy je zapewnić w przypadku wszystkich taksonów nie krzyżujących się krewniaczo (patrz niżej).

Trzeba koniecznie zauważyć, że gdy gatunki o krzyżowaniu zewnętrznym są zmuszone do krzyżowania wsobnego np. poprzez zmniejszenie ich liczby do kilku, wówczas pojawia się możliwość wystąpienia depresji inbredowej wraz ze wzrostem częstotliwości występowania homozygot. Można na przykład obejść samonieźgodność u *Brassica oleracea* (otwierając pąk kwiatowy i zapylając znamię), zmuszając go do krzyżowania wsobnego. W ostateczności doprowadzi to jednak do depresji inbredowej. Analogicznie, zachęcając gatunki o krzyżowaniu krewniaczym do krzyżowania nie spokrewnionego, można spowodować depresję outbredową i wzrost częstotliwości heterozygot. W obu przypadkach, spada stan zdrowotny osobników.

Metody zapylania

W większości przypadków należy ustawić się przy nośniku pyłku i przeprowadzić zapylanie sztucznie z wykorzystaniem różnych metod, najczęściej jednak przenosząc pyłek szczoteczką z główki pręcika jednej rośliny na znamię słupka innego osobnika.

Podstawą sukcesu w owocowaniu jest dobór terminu zapylania. Zdolność przyjmowania pyłku przez znamię słupka jest zależna od czasu, podobnie jak otwieranie główek pręcików i uwalnianie pyłku. Ponadto, czas życia pyłku waha się od 30 minut u niektórych traw do czasu znacznie dłuższego niż dzień u okrytozalążkowych i niektórych drzew owocowych (Richards, 1997) i wielu dni, np. u storczyków (Pritchard, H. W., komentarz ustny). Moment uwalniania pyłku można przyjąć za wskazówkę do określenia czasu dojrzałości pyłku (Pritchard, H.W., komentarz ustny). Ponieważ trudniej ocenić dojrzałość znamienia słupka, należy kilkakrotnie przeprowadzać ręczne zapylanie.

Najlepszą metodą zapewnienia zróżnicowania genetycznego podczas odtwarzania jest zastosowanie techniki wzajemnego krzyżowania w parach (patrz: Breese, 1989). osobniki do odtworzenia są losowo dobierane w pary a następnie (w przypadku roślin jednopiennych) krzyżowane obustronnie, z każdą z roślin zarówno jako osobnikiem macierzystym, jak i ojcowskim. Aby uniknąć pomyłek, należy oznaczyć rośliny. Najlepiej osobno przechowywać nasiona z każdej rośliny rodzicielskiej. Kolejną zalecaną metodą jest przechowywanie osobno nasion z każdej pary. Mimo, że zapewnia to zachowanie spójności genetycznej, nie jest to metoda zbyt praktyczna, ponieważ utrudnia obróbkę i przechowywanie nasion. Na przykład, nasiona trzeba będzie połączyć na potrzeby próby kiełkowania i dla przekazania próbek odbiorcom. Alternatywną, bardziej praktyczną metodą redukującą spójność genetyczną jest połączenie zbioru ze wszystkich roślin i jednoczesne wyrównanie udziału każdej rośliny rodzicielskiej w ogólnej masie. Niektóre instytucje (patrz: Chorlton *i in.*, 2003) przetrzymują pojedyncze zbiory nasion jako próbki ochroniarskie, “masę zbalansowaną” i pozostałą “masę niezbalansowaną” (tzn. z roślin produkujących nadmiar nasion) w celu zapewnienia nasion w przypadku szczególnego znaczenia reprezentatywności genetycznej lub wówczas gdy jest ona mniej ważna.



Rycina 27 Ponieważ zapylanie przez owady może prowadzić do hybrydyzacji, należy go unikać. (© RBGK)

W wielu przypadkach wzajemne krzyżowanie w parach może być zbyt czasochłonne. Wówczas można zastosować krzyżowanie pomiędzy wszystkimi osobnikami rodzicielskimi wybranymi do odtwarzania (polikrzyżowanie). Liczbę osobników uwidaczniających się w partii nasion można zwiększyć poprzez ręczne zapylenie wykonane w kilku terminach, tak aby wykorzystać kwitnienie wczesne i późne. Ważne jest zapewnienie braku dominacji jednego z rodziców w udziale użytego pyłku. I znowu, nasiona z pojedynczych osobników rodzicielskich należy w miarę możliwości trzymać osobno. Nieco gorszą opcją jest łączenie nasion, z wyrównaniem udziału każdego rodzica.

Najgorszą z możliwych opcji jest pozwolenie na całkowicie losowe zapylenie z zastosowaniem naturalnych nośników, takich jak wiatr lub dowolny obecny owad.

Izolacja genetyczna

Podczas odtwarzania konieczne należy unikać zanieczyszczenia przez przypadkowe przeniesienie pyłku z jednej kolekcji na inną kolekcję tego samego gatunku lub jego bliskiego krewniaka. Można to osiągnąć czyszcząc starannie szczotki i pęsety zapyłające oraz stosując procedury izolacji.

Izolację można prosto zachować rozdzielając kolekcje fizycznie. Odległość zależy od tego, czy u gatunku zachodzi możliwość zapylenia przez owady lub wiatr oraz od tego, jakie bariery fizyczne (szklarnie, moskitiery) rozdzielają kolekcje. Oczywiście, odległości izolowania będą ograniczone w zależności od powierzchni instytucji / ogrodu botanicznego. Dlatego też do wyboru są zapobieganie kwitnieniu pokrewnych kolekcji podczas zapyłania (możliwe u bylin) lub owijanie kwiatów oddychającymi torebkami aby zapobiec uwalnianiu pyłku i zapewnić dostęp pyłku jedynie z pożądanym kolekcji poprzez delikatne usunięcie torebek.

Stosując torebki, należy koniecznie pamiętać o stymulowaniu rozwoju kwiatów i owoców bez wzrostu uszkodzeń powodowanych przez nadmierną wilgotność i infekcje. Torebki stosuje się na wczesne stadia rozwoju pąków i można je usunąć po rozpoczęciu rozwoju owoców.

Warunki wzrostu

Nie da się zestandaryzować procesów odtwarzania dla wszystkich gatunków, a zalecenia i protokoły trzeba rozwijać na specjalnych podstawach. Szczegółowe dane o ekologii gatunków, badania i dokumentacja porównawcza na wszystkich etapach hodowli mają kluczowe znaczenie dla odtwarzania.

Aby uzyskać wymaganą do odtworzenia liczbę roślin, należy wysiać odpowiednią ilość nasion. Jeśli sieje się bezpośrednio w kompost lub glebę, kiełkowanie będzie słabsze niż w laboratorium. Ponadto, zanim rośliny osiągną stadium reprodukcyjne, mogą wykazywać wysoką śmiertelność. Te czynniki należy uwzględnić, szacując liczbę nasion do wysiewu.

Odtwarzanie należy prowadzić z zapewnieniem warunków ekologicznych takich, jak w populacjach macierzystych (światło, woda, gleba, temperatura itd.), jednak z wyłączeniem szkodników, chwastów i gryzoni. Rośliny muszą być odpowiednio rozmieszczone, tak aby nie konkurowały ze sobą. Liczne gatunki mogą nie wytworzyć nasion w pierwszym roku (latach), dlatego też trzeba zapewnić długotrwałe utrzymanie i stabilność poletek odnowieniowych. Zainicjowanie kwitnienia i dojrzewania owoców może wymagać specyficznych wyzwalaczy ekologicznych lub warunków, które muszą być dawkowane i kontrolowane sztucznie. W przypadku dojrzewania owoców i nasion może dotyczyć to dostępu wody i regulacji temperatury. Kiełkowanie i kolejne fazy rozwoju należy zaplanować stosownie do pory roku, tak by okres dojrzałości nasion współgrał z preferowanymi warunkami pogodowymi. Rośliny należy przeglądać regularnie. Przeglądy te stanowią okazję do potwierdzenia poprawnego wyboru materiału do hodowli.

Zbiór dokonuje się w stadium naturalnego rozsiewania. W wielu przypadkach, takich jak niepekające zarodnie, konieczne może być owinięcie owocostanów w torebki tuż przed rozsiewaniem.

Dokumentacja

Zbyt często ogrodnicy przechowują informacje we własnych głowach, zamiast zapisać je niezwłocznie. W przypadku wielu gatunków przechowywanych przez ENSCONET, dostępna jest uboga literatura na temat hodowli, nie mówiąc już o odtwarzaniu. Dlatego też należy zachęcać personel do dokumentowania każdego aspektu procesu odtwarzania. Informacje te, jeśli zostaną włączone do bazy danych, mogą okazać się unikalne i stąd niezwykle cenne dla innych banków nasion i osób zajmujących się ochroną przyrody lub projektami restytucji.

Załącznik 2 przedstawia sugerowany formularz danych. Przy szerszym rozpowszechnianiu danych, warto posiadać opis stanowiska odtwarzania, w tym typu gleby, reżimu temperatur, warunków świetlnych, reżimu wodnego i schematu sadzenia.

Mimo że brak takiej rubryki w **Załączniku 2**, przydatne są także informacje dotyczące proporcji zapylnych kwiatów, z których zebrano nasiona i plon nasion (ilość) z rośliny. Dane te mogą posłużyć do wytyczenia przyszłych sposobów regeneracji nasion.

Priorytety badawcze

Badanie różnorodności genetycznej może pomóc w zdefiniowaniu minimalnej wielkości próbek i liczby nasion do wytworzenia efektywnych populacji odtwarzających. Godne zaufania rozpoznanie pochodzeń, które można wykonać stosunkowo tanio i prosto, jest pomocne w monitoringu spójności odtworzonych próbek.

Brak informacji o systemie rozmnażania większości taksonów utrudnia odpowiednie postępowanie z kolekcjami do celów odtwarzania. Badania biologii reprodukcyjnej (np. wskaźniki krzyżowania zewnętrznego, płciowość i apomiksja) jest pomocą we właściwym zastosowaniu procedur odtwarzania.

ZAŁĄCZNIK 1. PODSUMOWANIE PODSTAWOWYCH SYSTEMÓW ROZMNAŻANIA U ROŚLIN

Informacje szczegółowe patrz Richards (1997).

♂ - męski (pręcik = główka z ziarnami pyłku + nitka pręcika)

♀ - żeński (owocolistek = zalążnia z 1 lub więcej zalążnią + znamię + szyjka)

♂♀ - obojnaczy – może odnosić się i do roślin, i do kwiatów

Organizacja kwiatu	Roślina	Kwiaty		Uwagi
Dwupienność ¹	♂ lub ♀	♂ lub ♀	Kojarzenie krzyżowane (obligatoryjnie)	A
Jednopienność ²	♂♀	♂ lub ♀	Kojarzenie krzyżowane	B
Dwupłciowość	♂♀	♂♀	Patrz niżej	C
Samo-niezdgodność				
- Gametofityczna	♂♀	♂♀	Kojarzenie krzyżowane	D
- Sporofityczna	♂♀	♂♀	Kojarzenie krzyżowane	E
Różne typy kwiatów dla gatunku ^a	♂♀	♂♀	Kojarzenie krzyżowane	F
Rozdzielenie główki pręcika i znamienia słupka – zapylenie wymaga obecności owada ^b	♂♀	♂♀	Kojarzenie krzyżowane	G
Uwolnienie pyłku i gotowość znamienia do zapylenia rozdzielone w czasie ^c	♂♀	♂♀	Kojarzenie krzyżowane	H
Kojarzenie krewniacze	♂♀	♂♀	Kojarzenie wsobne	I
Nasiona utworzone bezpłciowo ^d	♂♀	♂♀ lub ♀	Bezpłciowe	J

^a Heteromorfizm, ^b Herkogamia, ^c Dichogamia (Przedprątność - ♂ dojrzewają najpierw; Przedślupność - ♀ dojrzewają pierwsze), ^d Agamospermia.

¹ i ² Liczne warianty, np.:

Flower organisation	Plant	Flowers
¹ Żeńskodwupienność	♂♀ lub ♀	♂♀, ♂ lub ♀
¹ Męskodwupienność	♂♀ lub ♂	♂♀, ♂ lub ♀
² Żeńskojednopienność	♂♀	♂♀ lub ♀
² Męskojednopienność	♂♀	♂♀ lub ♂

Informacje szczegółowe patrz Richards (1997).

Uwagi		Komentarz	Przykłady
A	Dwupienność	Rzadko. Należy przyrzeć się kwatom.	Salicaceae. Tropikalne drzewa leśne.
B	Jednopienność	Rzadko. Należy przyrzeć się kwatom. Częsta dichogamia.	Duże rośliny zapylane przez wiatr lub wodę/rośliny z główkami/baldachami. Cyperaceae
C	Dwupłciowość	Bardzo powszechne. Przyrzeć się kwatom. Naturalne zapylenie bywa ważną wskazówką odnośnie systemu rozmnażania.	
D	GSI ³	Częstsze niż SSI. W większości rzędów roślin kwiatowych. Eksperymenty lub literatura.	Niektóre Poaceae, <i>Corylus avellana</i>
E	SSI ⁴	Doświadczalnie lub literatura.	Wiele Brassicaceae, Asteraceae
F	Heteromorfizm	Różne typy kwiatów – często wzajemna herkogamia (patrz niżej). Przyrzeć się kwatom. Morfy zazwyczaj krzyżują się, ale brak krzyżowania pomiędzy morfami.	Rubiaceae, Boraginaceae, Plumbaginaceae, Primulaceae (Pin / thrum <i>Primula</i>)
G	Herkogamia	Główka pręcika i znamię słupka są dobrze rozdzielone. Patrzeć na kwiaty.	Orchidaceae, Primulaceae
H	Dichogamia	Doświadczalnie lub literatura.	Caryophyllaceae (przedprętność), niektóre Brassicaceae, Rosaceae (předsłupność)
I	Krzyżowanie wsobne	Korelacja cech (patrz niżej) lub zamknięte kwiaty ("klejstogamia"), doświadczalnie lub literatura.	Wiele jednorocznych roślin pionierskich, gatunki uprawne.
J	Agamospermia	Niektóre gatunki mogą wytwarzać nasiona płciowo lub bezpłciowo. Literatura.	<i>Taraxacum</i> , niektóre <i>Ranunculus</i>

³ GSI (Samopłonność gametofityczna - Gametophytic Self Incompatibility). Patrz: Richards (1997). Niektóre allele kontrolują czynniki rozpoznawania działające zarówno wobec pyłku, jak i znamienia słupka. Czynniki działają niezależnie na diploidalne znamię i na haploidalny pyłek. Gdy pyłek i znamię niosą ten sam czynnik, następuje niezgodność i łagiewka pyłkowa nie wrasta w zalążek.

Genotypy pyłku	S1 i S2	S1 i S2	S1 i S2
Genotypy znamienia słupka	S1S2	S1S3	S3S4
	Niezgodne	Częściowo zgodne	W pełni zgodne

⁴ SSI (Samopłonność sporofityczna - Gametophytic Self Incompatibility). Patrz: Richards (1997). Kontrola ziarenek pyłku pochodzi ze sporofitycznej główki pręcika, która je wytworzyła. W ziarenkach pyłku wykazano dominację czynników niezależnych od alleli znamienia słupka.

Fenotyp pyłku	S1 (zakładając, S1 > S2)	S1	S1
Fenotyp znamienia słupka	S1S2	S1S3	S3S4
	Niezgodne	Niezgodne	W pełni zgodne

ZAŁĄCZNIK 2. PROPONOWANY FORMULARZ DANYCH DLA ODTWOR- ZONYCH KOLEKCJI

Stanowisko	
Położenie na stanowisku	
Numer kolekcji	
Rodzaj	
Gatunek	
Niższy takson	
Przewidywany system rozmnażania	
Status ochronny	
Data wysiewu	
Ilość wysianych nasion	
Data skielkowania	
Data zbioru nasion	Pierwszy Ostatni
Zbieracz(-e) nasion	
Izolacja (proszę zaznaczyć)	Brak kontroli: otwarte zapylenie Przestrzenne : najbliższy okaz tego samego rodzaju w odległości co najmniejmetrów Przestrzenne: najbliższy okaz tego samego gatunku w odległości co najmniejmetrów Bariera fizyczna dla pyłku/owadów (wyszczególnić) Inne (jakie) Nieznane
Zapylenie kontrolowane (proszę zaznaczyć właściwe)	Data zapylenia: Samozapylenie Zapylenie krzyżowe z osobnikiem tego samego pochodzenia Zapylenie krzyżowe z osobnikiem innego pochodzenia (podać numer kolekcji) Szczegóły:
Ilość roślin w kolekcji	

Ilość roślin, z których pozyskano nasiona	
Stosunek nasion do kolekcji oryginalnej z warunków naturalnych (zaznaczyć)	Nasiona zebrane z roślin wyhodowanych z materiału wegetatywnego zebranego w naturze (pokolenie 0) Nasiona zebrane z roślin wyhodowanych bezpośrednio z nasion zebranych w naturze (pokolenie 1) Nasiona zebrane z roślin wyhodowanych z nasion pokolenia 1 (pokolenie 2) Nieznane pokolenie = 9
Okazy zielnikowe (zaznaczyć)	Zebrane z roślin, z których pobrano nasiona (patrz następne 7 linijek) ie można zebrać odpowiedniego okazu zielnikowego Nie zebrano, ponieważ populacja była już zweryfikowana (patrz 8 linijek poniżej)
Data zbioru okazu zielnikowego	
Zbieracz okazu zielnikowego	
Cykl życiowy rośliny (zaznaczyć)	Jednoroczna Dwuletnia Wieloletnia
Wysokość rośliny (metry)	
Inny opis rośliny	Np. barwa kwiatu, zapach i inne cechy niewidoczne na okazie zielnikowym:
Czy wykonano zdjęcie (zaznacz)	Tak Lokalizacja fotografii Nie
Szczegóły zweryfikowanego wcześniej materiału	Osoba weryfikująca: Instytucja: Data: Zweryfikowany materiał (dziko rosnący żywy, dzikiego pochodzenia w uprawie, okaz zielnikowy itd.):
Status kolekcji (zaznacz)	Kompletna Potrzebne więcej nasion (podać szczegóły) Potrzebne więcej materiału zielnikowego (podać szczegóły)
NUwagi (data kwitnienia, owocowania itd.)	

TEMAT 10. DYSTRYBUCJA NASION

Podsumowanie autorstwa Alberta-Dietera Stevens (BGBM) w oparciu o prezentację Simona Liningtona (RBGK) i dalsze dyskusje.

Komentarz ogólny

Próbki nasion gatunków dziko rosnących są udostępniane przez banki genów z kilku powodów. Należą do nich teoretyczne i stosowane badania naukowe, edukacja, hodowla, reintrodukcja gatunków i regeneracja siedlisk. Badania stosowane i hodowla mogą dotyczyć także sektora prywatnego.

Wiele banków nasion przygotowuje listy nasion (niektóre on-line) dostępne dla potencjalnych użytkowników, którzy mogą na ich podstawie dokonywać wyboru. Listy te powinny odnosić się do kolekcji o odpowiedniej liczbie nasion, dopuszczalnym poziomie kiełkowania i potwierdzonym rozpoznaniu. Nie należy udostępniać kolekcji, których dystrybucja podlega restrykcjom prawnym, rządowym, nałożonym przez park narodowy itp. Gatunki znane jako silnie inwazyjne lub szkodliwe także nie powinny być udostępniane (lub w przypadku udostępnienia należy zaopatrzyć je w wyraźne ostrzeżenie). W miarę możliwości, dane (w tym dane dotyczące warunków kiełkowania) należy dołączyć do listy nasion; jeśli nie, dane dotyczące przekazywanych nasion powinny być dystrybuowane wraz z nimi w wersji papierowej z potwierdzeniem lub w wersji elektronicznej. Jeśli za udostępnienie nasion pobierane są opłaty manipulacyjne, należy zaznaczyć to wyraźnie na liście; w większości przypadków opłata manipulacyjna ledwo pokrywa koszty administracyjne poniesione na uzyskanie tej kwoty.

Bank nasion powinien posiadać podstawowy zapas nasion, które nie są udostępniane. Można to osiągnąć albo poprzez fizyczne rozdzielenie próby podstawowej (do ochrony) od próby aktywnej (użytkowej), albo poprzez stworzenie systemu kontroli zapasu w bazie danych banku nasion sygnalizującego moment, gdy zużyta zostaje cała aktywna część kolekcji. W drugim opisanym przypadku, niezbędne może być stworzenie marginesu bezpieczeństwa w systemie ostrzegania, który spowoduje, że komputer wyświetli mniejszą ilość nasion niż faktycznie znajduje się w banku. Efekt ten można uzyskać określając wyższą granicę poziomu ufności na podstawie średniej masy 5 próbek po 50 nasion podzielonej przez całkowitą masę nasion pomnożoną przez 50, co daje całkowitą liczbę nasion (patrz [Temat 1](#)).

Ze względu na zwierzchnictwo państwa i problemy własności zasobów genetycznych (od Konwencji o Różnorodności Biologicznej: <http://www.cbd.int> po Międzynarodowy Traktat o Zasobach Genetycznych Roślin w Rolnictwie i Wyżywieniu: <http://www.planttreaty.org/>), próbki nasiona przesyła się zwykle na podstawie wiążącego prawnie porozumienia o przesyłce materiału (MTA), które określa do czego można wykorzystać nasiona, czy można je przekazać osobom trzecim i jakie korzyści z udostępnienia nasion będą wspólne. W rezultacie porozumienie to zapewnia, że warunki, na jakich nasiona zebrano, zostaną scedowane na użytkownika. Zazwyczaj nasiona przesyła się po otrzymaniu podpisanego porozumienia. Można także zastosować licencję ograniczoną, która umożliwia użytkownikowi podpisanie porozumienia w momencie odbioru nasion. Przykłady zastosowania porozumienia (MTA) są do wyszukania na stronie internetowej Millennium Seed Bank (<http://data.kew.org/seedlist/msa.pdf>). Koniecznie należy dowiedzieć się, do czego użytkownicy wykorzystają nasiona, co można umieścić w porozumieniu.

Kolejnym zagadnieniem związanym z dystrybucją nasion jest kwestia stanu fitosanitarnego materiału. W obrębie Unii Europejskiej nasiona mogą być przekazywane swobodnie. Jednak przy ich transporcie do lub z Unii Europejskiej, należy dostosować się do odpowiednich regulacji fitosanitarnych. Ponadto, zawsze należy porozumieć się z instytucjami nadzorującymi w kraju obieg gatunków (<http://www.cites.org>) i Dyrektywy Siedliskowej (http://ec.europa.eu/environment/nature/legislation/habitatsdirective/index_en.htm).

Przed wyjęciem próbek, pojemniki należy ocieplić, aby nie dopuścić do kondensacji pary wodnej na powierzchni nasion (czas ogrzewania zależy od wielkości pojemnika, zwykle jednak wystarczą 24 godziny). Próbkę wyjmuje się losowo i pakuje w torebki foliowe (zapobiegające wchłanianiu wilgoci przed użytkowaniem) umieszczone w odpornych na zagniecenia kopertach. Dokumenty fitosanitarne i inne umieszcza się w plastikowych torebkach na zewnętrznej stronie kopert.

W RBG Kew stwierdzono, że przydatny może być samosprawdzający się numer seryjny (sześciocyfrowy numer z cyfrą kontrolną obliczaną na jego podstawie) – zmniejsza on ilość błędów popełnianych przy przygotowywaniu zamówień nasion.

Bank nasion musi przechowywać informację o odbiorcach próbek materiału (dzięki temu można również uniknąć powtórzeń w zamówieniach) i o zastosowaniach nasion. Informacja ta ma dużą wartość, gdy trzeba udowodnić wartość kolekcji w bankach nasion. W miarę możliwości, managerowie banków nasion powinni omawiać, jakie typy kolekcji są pożądane przez potencjalnych użytkowników; dzięki czemu zapewnić można maksymalne wykorzystanie zasobów.



Rycina 28 Próbkę aktywne w Millenium Seed Bank. (© RBGK)

LITERATURA

Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E. Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2006). Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma. Manuali e Linee Guida 37/2006. APAT, Italy.

Bacchetta, G., Bueno Sánchez, Á., Fenu, G. Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2008). Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. pp. 378.

Baskin, C.C. & Baskin, J.M. (1998). Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, London.

Baskin C.C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds: focusing on the lens. *New Phytologist* 158(2): 229-232.

Baskin, C.C., Thompson, K. & Baskin, J.M. (2006). Mistakes in germination ecology and how to avoid them. *Seed Science Research* 16: 165-168.

Bone, J., Turner, R. & Tweddle, J. (2003). The Millennium Seed Bank Project's specimen and taxon databases. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 327-336. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_18.pdf

Bridson, D. & Forman, L. (1998). *The herbarium handbook*. Revised edition. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Breese, E.L. (1989). Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. Free download from: http://www.bioversityinternational.org/publications/Web_version/209/

Butler, L.H., Hay, F.R., Ellis, R.H. & Smith, R.D. (2009). Post-abscission pre-dispersal seeds of *Digitalis purpurea* L. remain in a developmental state that is not terminated by desiccation ex planta. *Annals of Botany* 103: 785-794.

Chorlton, K.H., Sackville Hamilton, N.R., Thomas, I.D. & Jones, M.H. (2003). Vegetative collection of forage grasses and legumes, and method of regeneration for seed. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 203-207. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_10.pdf

Center for Plant Conservation (1986). *Recommendations for the Collection and Ex Situ Management of Germplasm Resources from Rare Wild Plants*. Jamaica Plain, Mass., USA.

Crane, J., Miller, A.L., Van Roekel, J.W. & Walters, C. (2003). Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Planta* 217: 699-708.

Cromarty, A.S., Ellis, R.H. & Roberts, E.H. (1990). *Handbooks for Genebanks: no. 1, The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation*. Revised edition. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.

Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. & Tompsett, P.B. (1990). Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany* 65: 197-204.

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1985). *Handbooks for Genebanks: No. 2, Handbook of Seed Technology for Genebanks, Volume I. Principles and Methodology*. International Board for Plant Genetic

Resources, Rome, Italy. http://www.bioversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/handbook_of_seed_technology_for_genebanks_vol_i_principles_and_methodology.html

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1990). An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1995). Handbooks for Genebanks: No. 3 Handbook of Seed Technology for Genebanks - Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. Available on the internet: <http://www.bioversityinternational.org/publications/Web%5Fversion/52/>

Ellis, R.H. & Hong, T.D. (2007). Seed longevity – moisture content relationships in hermetic and open storage. *Seed Science & Technology* 35: 423-431.

Ellis, R.H. & Roberts, E.H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13–30.

ENSCONET (2009). ENSCONET Seed Collecting Manual for Wild Species. <http://www.ensconet.eu/Download.htm>

ENSCONET database schema (2009) <http://www.ensconet.eu/Database.htm>

FAO / IPGRI (1994). Genebank Standards. Food and Agriculture Organisation of the United Nations / International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy. http://www.bioversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/genebank_standards.html

Finch-Savage, W.E. & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–523.

Funk, V.A., Hoch, P.C., Prather, L.A. & Wagner, W.L. (2005) The Importance of Vouchers. *Taxon* 54(1): 127-129.

Goldblatt, P., Hoch, P.C. & McCook, L.M. (1992) Documenting Scientific Data: The Need for Voucher Specimens. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74(4): 969-970.

Gomez-Campo, C. (2002). Long-term seed preservation: the risk of selecting inadequate containers is very high. *Monographs ETSIA, Univ. Politecnica de Madrid* 163: 1-10.

Gomez-Campo, C. (2006). Erosion of genetic resources within seed banks: the role of seed containers. *Seed Science Research* 16: 291-294.

Gomez-Campo, C. (2009). Efficient long term seed preservation. *Monographs ETSIA, Univ. Politecnica de Madrid* 171: 1-3.

Gosling, P.G. (2003). Viability testing. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 445-481. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_24.pdf

Havens, K., Guerrant, E.O., Maunder M. & Vitt, P. (2004). Appendix 3. Guidelines for Ex Situ Conservation Collection Management: Minimising Risks. In: Guerrant, E.O., Havens, K. & Maunder, M. (eds). *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, U.S.A.

Hay, F.R. & Probert, R.J. (1995). Seed maturity and the effect of different drying conditions on desiccation tolerance and seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L). *Annals of Botany* 76: 639-647.

- ISTA (2008). International Rules for Seed Testing (edition 2008). International Seed Testing Association. Switzerland.
- Linington, S.H. (2003). The design of seed banks. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 591-636. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_33.pdf
- Liu, K., Eastwood, R.J., Flynn, S., Turner, R.M. & Stuppy, W.H. (2008). Seed Information Database (release 7.1, May 2008). <http://www.kew.org/data/sid>
- Manger, K.R., Adams, J. & Probert, R.J. (2003). Selecting containers for the Millennium Seed Bank Project: a technical review and survey. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 637-652. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_34.pdf
- Millennium Seed Bank Project website www.kew.org/msbp
- MSBP Technical Information Sheet 5. <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/05-eRH%20moisture%20measurement.pdf>
- MSBP Technical Information Sheet 10 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/10-Desiccation%20tolerance.pdf>
- MSBP Technical Information Sheet 14 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/14-Seed%20cleaning.pdf>
- MSBP Technical Information Sheets and Manuals http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/info_sheets.htm
- Offord, C.A. & Meagher, P.F. (2009). Plant Germplasm Conservation in Australia: Strategies and guidelines for developing, managing and utilising ex situ collections. The Australian Network for Plant Conservation in partnership with Australian Seed Conservation and Research.
- Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2007). High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. Seed Science and Technology 35: 143-153.
- Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2008). Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content. Seed Science and Technology 36: 407- 422.
- Pritchard, H.W. & Dickie, J.B. (2003). Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 653-722. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_35.pdf
- Pritchard, H.W. & Nadarajan, J. (2008). Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Reed B.M. (ed.). Springer Verlag, pp 485- 501.
- Pritchard, H.W., Poynter, A.C. & Seaton, P.T. (1999). Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-drying and cryopreservation. Lindleyana 14: 92-101.
- Pritchard, H.W. & Seaton, P.T. (1993). Orchid seed storage. Historical perspective, current status and future prospects. Selbyana 14: 89-104.
- Probert, R.J. (2003). Seed viability under ambient conditions and the importance of drying, In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into

Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 337-365. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_19.pdf

Probert, R., Adams, J., Coneybeer, J., Crawford, A. & Hay, F. (2007). Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany* 55: 326-335.

Probert, R.J., & Hay, F.R. (2000). Keeping Seeds Alive. In: Black, M. & Bewley, J.D. (eds.), *Seed Technology and its Biological Basis*. 375-410. Sheffield Academic Press.

Probert, R.J., Manger, K.R. & Adams, J. (2003). Non-destructive measurement of seed moisture. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 367-387. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_20.pdf

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Jarind, M. (2006). Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy. For free download: http://www.bioversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/manual_of_seed_handling_in_genebanks.html

Richards, A.J. (1997). *Plant Breeding Systems*. Chapman & Hall, London.

Roberts, E.H. & Ellis, R.H. (1989). Water and seed survival. *Annals of Botany* 63: 39-52.

Schmidt, L. (2000). *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.

Smith, R.D., Dickie, J.B, Linington, S.H. Pritchard, H.W. & Probert, R.J. (eds). (2003). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*: Royal Botanic Gardens, Kew, UK. <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>

Stanwood, P.C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, Kartha K.K. (ed). pp. 199-226. Boca Raton: CRC Press.

Terry, J., Probert, R.J. & Linington, S.H. (2003). Processing and maintenance of the Millennium Seed Bank collections. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 307-325. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_17.pdf

Thain, M. & Hickman, M. (2000). *The Penguin Dictionary of Biology*. Tenth edition. Penguin Books, London, UK.

Tompsett, P.B. (1986). The effect of temperature and moisture content on the longevity of seed of *Ulmus carpinifolia* and *Terminalia brassii*. *Annals of Botany* 57: 875-883.

Vertucci, C.W., Roos, E.E. & Crane, J. (1994). Theoretical basis of protocols for seed storage. 3. Optimum moisture contents for pea-seeds stored at different temperatures. *Annals of Botany* 74: 531-540.

Walters, C., Wheeler L. & Stanwood, P.C. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48: 229-244.

Walters, C. (2007). Materials used for seed storage containers: response to Gómez-Campo [Seed Science Research 16: 291–294 (2006)]. *Seed Science Research* 17(4): 233-242.