



## **TTC-METODEN** **ETT SÄTT ATT UPPTÄCKA ROTSKADOR**

Frilandslagring av täckrotsplantor under vintern kan under ogynnsamma snö- och temperaturförhållanden ge upphov till rotskador. Dessa skador är för-  
rädiska, eftersom ovanjordsdelen även hos dödligt skadade plantor kan se  
helt normal ut vid tidpunkten för uttransport till plantering. Detta PLANT-  
NYTT behandlar en inom svensk skogsforskning tämligen oprövad kemisk metod  
att mäta graden av livskraft i en vävnad.



Vinterlagring under knappa snöförhållanden

### **INLEDNING**

Försök att vid kemiska analyser kunna fastställa eventuella skador hos skogsplantor har varit sparsamma i Sverige. Från bland annat USA finns däremot ett flertal rapporter om positiva erfarenheter av sådana metoder. Vanligen har studierna avsett olika sorters fruktträd.

Den största fördelen med en tillförlitlig kemisk analys är att man får ett mycket snabbt svar på huruvida en skada inträffat eller inte. En annan stor fördel är möjligheten att testa olika delar av en planta (eller ett träd). Man kan därmed få besked om eventuella olikheter i kondition mellan t ex ovanjordsdel och rot.



Sin största tillämpning har de kemiska metoderna fått vid utvärdering av köldskador. Som nämnts i ingressen är sådana skador ofta mycket vanskliga att bedöma okulärt. Det är inte ovanligt att till synes svårt skadade plantor repar sig igen, samtidigt som tidigare "oskadade" plötsligt börjar att dö.

Frilandslagring på upphöjt underlag under vintertid förekommer på många olika plantskolor och med olika plantsystem. Ett tidigare PLANTNYTT (1981:5) har redogjort för de risker som är förknippade med detta. I ett nytt projekt vid avdelningen för skogsförnyelse i Garpenberg studeras nu plantrötters köldhärdighet mer i detalj. Försöket omfattar gran, tall och contorta, två skilda såddtidpunkter och ett stort antal olika provenienser. Dessutom undersöks hur olika förbehandlings (nattlängd- och temperaturreglering) påverkar plantornas härdighetsutveckling.

Efter avslutad frystest kontrolleras plantornas tillstånd genom att de planteras i en för tillväxt optimerad miljö. Tre veckor senare sker en slutlig bedömning av hur plantan klarat sig, varvid bland annat nybildningen av rötter och längdtillväxt registreras.

Som komplement till dessa mätningar har vi funnit det intressant att prova den vid de tidigare nämnda undersökningarna vanligast förekommande kemiska analysmetoden, den så kallade TTC-metoden.

## TTC-METODEN

TTC står för Trifenyl-tetrasoliumklorid, vilket är ett salt. I korthet går metoden ut på att ett vävnadsprov placeras i en lösning av detta ämne. Under vissa förhållanden reduceras då TTC till ett ämne benämnt formazan, vilket färgar vävnaden röd. Graden av rödfärgning utgör sedan ett mått på hur levande vävnaden är. Starkt röd färg indikerar en högre vitalitet än svagare röd färg.

## TILLÄMPNING

Under den gångna hösten har några forskare från avdelningen för skogsförnyelse haft förmånen att få besöka Institutet för landskapsplanter i Hornum, Danmark. TTC-metoden är där sedan flera år tillbaka en standardmetod vid bedömning av plantors kondition. Det exakta tillvägagångssättet varierar något mellan olika undersökningar. Nedan beskrivs den metodik som används i Danmark.

Vid provtagningen för rottester kasseras först nedre delen av roten genom att torvklumpen skärs rakt av, ca tre cm ovanför botten. De kvarvarande rötterna friläggs genom att torven sköljs bort med vatten. Rötterna snittas sedan upp i 2-5 mm långa bitar av vilka 200 mg vägs upp. Mycket viktigt är att rotprovet tas på exakt samma sätt för varje enskild planta. Detta beror på att förmågan att reducera TTC är olika för finrötter och grövre rötter.

Provbitarna läggs därefter i ett provrör och 0.6 % TTC-lösning tillsätts. Själva vätskan har en sammansättning som gör att den har ett lämpligt pH, vilket ligger på ca 7.5. Vid denna nivå är förutsättningarna för reduktion av TTC maximalt gynnsamma. Detta accentuerar eventuella skillnader mellan olika plantor, vilket medför bättre möjligheter att gradera skadans svårighet.

Provet ställs sedan i exsickator under 90 min för infiltrering, d v s TTC skall kunna tränga in i cellerna. Sedan sker en inkubering, vid vilken reduktionen äger rum, i värmeskåp vid +30°C under 24 timmar. Efter avslutad inkubering silas vätskan i provröret bort och röret sköljs med destillerat vatten. Rotbitarna läggs tillbaka i röret och 7 ml 96 % alkohol fylls på. Kokning i vattenbad vid ca +85°C under 15 min vidtar, varefter provet kyls ned och alkohol fylls på upp till 15 ml-strecket i provröret. Vid kokningen sker en extraktion av formazan från roten ut i den omgivande alkoholen.



Färgen på lösningen blir då, beroende på rötternas vitalitet vid provtagningstillfället, mer eller mindre starkt rödfärgad. För enklare ändamål kan en okulär bedömning vara tillräcklig. Mer nyanserade bedömningar kräver emellertid att färgen hos provet kan bestämmas mer exakt. Detta sker med hjälp av en spektrofotometer. I denna genomlysning av provet med ljus av en bestämd våglängd, vanligen 520 nm. Ju starkare färg provet har, desto mer av ljuset absorberas. Man mäter därför absorbansen och denna utgör ett objektivt och mycket noggrant mått på färgningsgraden.

## TOLKNING AV RESULTATEN

Vid reduktionen av TTC till formazan är ett stort antal faktorer inblandade, vilket gör det svårt att beskriva exakt vad som händer. Bland annat är flera olika enzymer verk samma. Samtliga enzymer är nödvändiga komponenter i olika fysiologiska funktioner. TTC-reduktionen synes därför kunna vara ett bra mått på en plantas allmäntillstånd. Har livsfunktionerna upphört helt kan ingen reduktion av TTC ske. I praktiken reduceras ändå mindre mängder av diverse störkällor, framför allt olika bakterier. Hur stor denna felkälla är varierar högst avsevärt beroende på hur lång tid som förflutit mellan skadetidpunkt och mättillfälle. Om mätning sker omedelbart efter skadan inträffat, är denna felkälla obetydlig. Den kan däremot vara betydligt större om man först på våren testat plantor som fått en köldskada redan hösten innan. Längre än några dagar efter det att en skada befaras ha inträffat bör man inte vänta med en eventuell test.

Som ovan nämnts blir ett prov aldrig fullständigt färglöst. I en amerikansk undersökning studerades hur

stor den av olika störkällor orsakade reduktionen var. Det konstaterades att vid en mätning omedelbart efter att plantan dödat (genom nedfrysning till  $-50^{\circ}\text{C}$ ) låg reduktionen av TTC på endast 2 % av nivån för oskadade kontrollplantor. Plantmaterialet var murgröna. I samma undersökning exponerades också ett stort antal plantor för olika temperaturer. Olika grad av rödfärgning erhöles vid TTC-testerna, och det visade sig att plantor med en färgningsgrad under hälften av nivån för kontrollplantorna dog i efterföljande utplanteringsförsök. Samtidigt överlevde alla plantor vars TTC-reduktion var högre än hälften av kontrollplantornas. I detta enskilda fall var överlevnadsgränsen alltså mycket entydig. Den kan dock säkerligen variera en hel del beroende på framförallt vilken art det gäller. För våra vanliga trädslag synes några motsvarande undersökningar inte finnas.

I Sverige finns erfarenheter av TTC-metoden främst från analyser av frö. Vid dessa analyser studerades bl a mer i detalj i vilka olika delar av frövävnaden som reduktion av TTC till formazan äger rum. Tolkningsresultatet var emellertid ofta svår. På frösidan har dessutom utvecklingen av andra och bättre analysmetoder bidragit till ett minskande intresse för TTC-metoden.

## FÖRSÖK VID SLU

Vid avdelningen för skogsförnyelse testas för närvarande TTC-metoden inom det tidigare beskrivna projektet "Plantrötters köldhärdighet". Hittills föreligger resultat endast från några mindre pilotstudier. Dessa har mycket samstämmigt visat på god korrelation mellan färgningsgrad och den temperatur som plantorna utsatts för. En av testerna redovisas i figur 1 nedan.

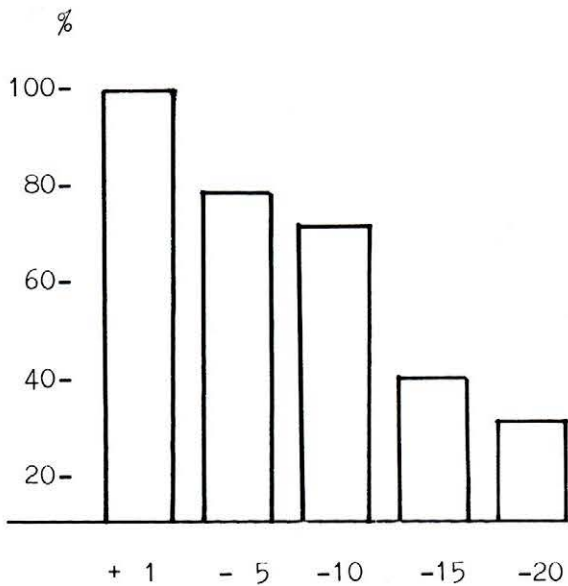


Fig 1. TTC-reduktion hos mellansvensk gran efter frystestet av rötter vid olika låga temperaturer. Referensplantornas, som utsatts för +1°C, värde är satt till 100 %.

En mycket stark sänkning av TTC-reduktionen inträffade i intervallet -10° till -15°. Samtliga plantrötter som utsatts för -15° eller kallare hade en TTC-reducerande förmåga som understeg 50 % av kontrollplantornas. I detta försök har inte någon överlevelse efter frystestet kunnat studeras men det verkar troligt att överlevelsegränsen ligger någonstans

mellan 10 och 15 minusgrader. Uttryckt i förmåga att reducera TTC ligger gränsen mellan 40 och 70 % av kontrollplantornas. Detta stämmer väl överens med den tidigare refererade undersökningen av murgröna.

Kommande tester avser i första hand att försöka klarlägga huruvida ett samband föreligger även mellan TTC-värde och plantans rottillväxtkapacitet. Om ett sådant samband finns, vilket förefaller troligt, skulle TTC-metoden kunna bli ett värdefullt tillskott i sökandet efter nya och bättre former för bestämning av plantkvalitet.

## SLUTORD

TTC-metoden är en metod att på kemisk väg bestämma graden av livskraft i en vävnad. Den har provats vid avd för skogsförnyelse i några pilotförsök och visat lovande resultat.

Trots den positiva bild av metodens möjligheter vi har idag måste dock betonas att detta inte är någonting som är färdigt att börja användas praktiskt. Ännu återstår mycket av tester och försök innan en slutlig utvärdering kan göras.

Författare till artikeln är Christer Nyström, Sveriges lantbruksuniversitet, avd för skogsförnyelse, Garpenberg. Tel 0225/22100