

MIRJANA UJEVIĆ, A. UJEVIĆ

**TETRAZOL TEST U KOMPARACIJI S
KLASIČNIM METODAMA ISPITIVANJA
KLIJAVOSTI SJEMENA**

Ispitivanje klijavosti kao osnov kvaliteta sjemena postalo je već odavno redovita praksa mnogih laboratorija u svijetu, a u svrhu dobivanja točnih informacija o sjetvenoj vrijednosti sjemena, zatim zbog objektivnije kupoprodaje sjemena i zaštite proizvođača od nepoželjnih posljedica koje se mogu pojaviti u proizvodnji radi nedovoljnog poznavanja vrijednosti sjemena.

Porastom prometa sjemenom ukazala se potreba bržeg dobivanja rezultata klijanja, tj. brže dokumentacije o kvalitetu sjemena namijenjenog prometu, pa su istraživanja u tom pravcu počela vrlo rano.

DIMITRIEWICZ (1876) je tretirao raspolovljena zrna ječma sumpornom kiselinom i zapazio je različito bojenje između vitalnih klica u određenom vremenu tretiranja.

Kasnija istraživanja, paralelno s razvitkom biokemije, usmjerena su u korištenju enzimatskog aparata u sjemenu kao indikatora vitalnosti sjemena. Od svih poznatih enzima enzim katalaza pokazao se u to vrijeme kao najpodesniji za ovu svrhu. Poznato je, da ovaj enzim sprječava akumulaciju vodikovog superoksida (H_2O_2) cijepanjem, prema slijedećoj formuli: $2H_2O_2 = 2H_2O + O_2$. Oslobođeni kisik moguće je direktno mjeriti, pa se prema njegovoj količini prosuđivala i vitalnost sjemena. Međutim, daljnja ispitivanja opovrgla su ovu metodu, budući se dokazalo da izvjesna aktivnost katalaze postoji i kod mrtvog sjemena. Ovakva sasvim kemijska metoda nije mogla dovesti do željenih rezultata iz jednostavnog razloga, što je bazirala na kvantitativnom određivanju vitalnosti određene količine sjemena, dok biološka vrijednost pojedinih sjemenki ovim načinom ostaje nepoznata.

Izvjestan napredak u ovom pravcu učinio je TURESSON (1922) ispitivanjem djelovanja dehidraza, koje su više od ostalih enzima u svojoj aktivnosti vezane uz živo tkivo stanice. Međutim, i ova metoda imala je nedostatak, što također ne bazira na ocjeni vitalnosti pojedinih sjemenki, već određene količine sjemena.

Metoda Turessona bazira na svojstvu metilenskog plavila, da se reducira na bezbojni metilen posredovanjem dehidraza u živim stanicama.

NELJUBOV (1925) je dokazao, da je indigo-karmin od svih anilinskih boja najpodesniji indikator razlikovanja živih i mrtvih embrija u sjemenu. Indigokarmin ima svojstvo da u slabijim koncentracijama prodire u mrtvo tkivo embrija i da ga oboji plavo. Ova metoda pokazala se praktičnom iz-

MIRJANA UJEVIĆ dipl. ing. poljopr. — ANTE UJEVIĆ dipl. ing. poljopr.

Fakultet poljoprivrednih znanosti —

OOUR Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja

Zavod za ispitivanje sjemena

ZAGREB

razito za šumsko sjeme, koje dugo vremena ostaje u dormantnom stanju, dok za poljoprivredne kulture ne udovoljava svrsi.

Japanac HASEGAWA (1932) slovio je kao prvi koji je prešao na ispitivanje pojedinih sjemenki pomoću otopine telurovih soli, koja posredovanjem dehidraza živih stanica embrija prelazi iz bezbojne u crnu boju koja nije podesna za uočavanje nijansa bojenja.

Ipak, nakon mnogih istraživanja raznim kemijskim sredstvima u prvi plan je zatim izbio rad dr BOŽE TURINE (1922)* koji je de facto preteča metoda bojenja solima selena i telura i prvi zapazio da žive stanice sjemena pretvaraju bezbojnu otopinu soli selena u crvenkastu odnosno soli telura u crnkastu boju, dok mrtva tkiva ostaju bezbojna.

Prema tome sva kasnija ispitivanja upotrebom selena i telura zapravo su nastavak rada Turine (Hasegawa 1932, Eidmann 1938, Schmidt 1937, 1939, Lakon 1939, 1942).

Ovaj metod se nije proširio u praksi zbog toksičnih svojstava i neugodna mirisa ovih soli, ali je dao podstreka za daljnja istraživanja u potrazi za takvim sredstvima bez otrovnih svojstava što je konačno i uspjelo Lakonu (1942).

LAKON (1940) nastavio je rad na bazi natrium biselenita, i prvi uočio važnosti bitnih dijelova embrija u bojenju kao indikatora životne sposobnosti sjemena, uzimajući u obzir nekrotična mjesta kao mjerilo stupnja odumiranja sjemena. Zasluga je Lakona, da je prvi razradio topografski kriterij na osnovu kojega je moguće razlikovanje normalnih i abnormalnih klica, što je od bitnog značenja za rezultate rutinskog ispitivanja u laboratorijima za ispitivanje sjemena i njihova reproduciranja zbog provjere točnosti rezultata.

On je također dao tehnički postupak i metodu rada gotovo za sve poljoprivredne vrste sjemena, dok su istraživači prije njega tretirali uglavnom šumsko sjeme.

Nadalje važno je spomenuti da je Lakon (1942) prvi zamijenio selenove soli tetrazol solima, koje imaju znatnih prednosti u ispitivanju klijavosti sjemena. U prvom redu tetrazol nije otrovan za razliku od selenovih soli, otopina lakše prodire u klicu, preciznost je bolja i dobiva se više na vremenu zbog mogućnosti bržeg dolaženja do rezultata.

Između nekoliko vrsta tetrazol soli dokazao je, da je za ovu svrhu najpodesniji 2,3,5, Triphenyltetrazol klorid, koji se kao bezbojna vodena otopina reducira posredstvom dehidraza na karmin-crveni formazan.

Važno svojstvo 2, 3, 5 Triphenyltetrazol klorida je relativna dobra otpornost prema kisiku, tako da je moguć rad u aerobnim uvjetima, a inače ne difundira u mrtvo tkivo i posjeduje neograničenu postojanost, tako da — jednom obojeni dijelovi embrija zadržavaju dugo nepromijenjenu sliku, što znatno olakšava rad na klasifikaciji klica.

U provjeravanju Lakonove metode nastala su razna iskustva kod raznih autora, koja su često bila u kontradiktornim stavovima, ali istrajnim radom i striktnom primjenom te metode praksa je sve više išla u prilog Lakona,

* Dr Božo Turina (Kraljevica 1890 — Zagreb 1970) naš zaslužni poljoprivredni stručnjak osobito na širenju djetelinskih i travnih kultura, osnivač livadarskih zadruga, siliranja i pregonskih pašnjaka u Hrvatskoj.

pa je cilj ovog rada da doprinese raščišćavanju nesporazuma u pogledu vrijednosti ove metode i da ukaže na njenu ulogu, koju ima kao suvremena biokemijska metoda ispitivanja klijavosti sjemena.

Noviji radovi na daljnjem usavršavanju i primjeni topografske biokemijske tetrazol test metode po Lakonu objavilo je više autora od kojih se posebno ističu dr H. Bulat (1961), Lindenbein (1960), prof. Moore (1961, 1964. i 1965).

Odbor za tetrazol test pri I S T A-i na kongresu u Lisabonu 1962. g. usvojio je stanovište, da rezultati po tetrazol testu i rezultati ispitivanja klijavosti nisu potpuno identični, budući pomoću tetrazol testa određujemo zapravo tzv. potencijalnu klijavost, kako ju je nazvao Lakon, a to drugim riječima znači, da određujemo mogućnost dobivanja određenog postotka za život sposobnih ili nesposobnih klica, za razliku od samog ispitivanja klijavosti klasičnim postupkom, kojim utvrđujemo stvarni postotak normalnih i abnormalnih klica. Ovo ipak nije isključivo vrijednost tetrazol testa, što je dokazano kasnijim mnogobrojnim pokusima i komparativnim ispitivanjima, koja je organizirala I S T A-e, putem brojnih ustanova za ispitivanje sjemena, uključivo i Zavod za ispitivanje sjemena u Zagrebu.

Rezultati ispitivanja klijavosti sjemena u komparaciji s tetrazol testom u pokusima koje je organizirala I S T A putem članica pod šiframa od 1 do 11, (za sjeme žitarica, trava i djetelina te uljarica i povrtnog sjemena) vidljivi su iz sljedećih tabela.

Žitarice

Uzorak br.:	Triticum aestivum		Secale cereale				Hordeum vulgare				Avena sative			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			
Stanica br.:	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT		
1	77	75	93	92	90	85	51	47	90	89	82	77	91	93
2	69	74	87	91	81	86	48	45	92	90	84	84	95	91
3	74	72	92	92	87	85	49	48	93	91	88	87	95	95
4	71	75	92	94	84	88	46	47	93	94	86	85	96	96
5	73	77	91	87	86	90	44	41	91	92	85	87	94	91
6	72	69	91	91	81	80	47	47	92	89	86	82	95	93
7	71	73	90	91	84	85	44	44	95	95	86	85	88	90
8	68	76	87	89	84	89	47	49	95	93	83	90	93	93
9	71	74	88	89	84	83	42	43	94	92	87	87	94	97
10	69	67	89	89	84	86	44	40	90	81*	84	67*	92	90
11	72	69	94	91	88	88	44	51	91	94	80	83	88	94
I	72	73	90	91	85	86	46	46	92	91	85	83	93	93
Prosjek														
II	—	—	—	—	—	—	—	—	—	92	—	85	—	—

* Izvan tolerancije za klijavost prema I S T A-i.

KK = % klijavosti klasičnom metodom

TT = rezultati tetrazol testa u %

Trave i djeteline

Uzorak br. Stanica br..	Agrostis alba		Poa pratensis		Phleum pratense		Festuca pratensis		Trifolium pratense			
	8		9		10		11		15		16	
	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT
1	75	76	83	86	72	72	25	29	91	90	64	62
2	53	45	81	86	73	68	21	29	86	82	47	44
3	64	65	83	89	69	70	25	23	80	77	21*	21*
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	54	27*	87	83	75	61	27	33	88	89	54	50
6	73	73	90	88	73	77	32	38	85	78	44	33*
7	51	68	31*	65*	64	66	24	36	83	86	40	60
8	64	51	85	76	74	73	28	23	90	78	55	47
9	70	73	82	89	68	75	24	29	81	81	47	49
10	38*	56	78	84	55*	54*	23	16*	83	79	36*	36*
11	70	70	85	85	75	80	27	33	87	85	58	56
Prosjek												
I	61	65	79	83	70	70	26	29	85	83	47	46
II	64	64	84	85	71	71	—	30	—	—	51	53

* Izvan tolerancije na klijavost prema I S T A-i.

Uljarice i povrtno sjeme

Uzorak br.: Stanica br.:	Brassica napus		Pisum sativum		Spinacea oleracea		Cucumis sativus					
	12		13		14		17		18		19	
	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT	KK	TT
1	17	19	91	94	72	73	—	—	—	—	—	—
2	24	8*	84	85	28*	30*	46	41	70	63	80	81
3	8*	7*	80	82	63	60	34	32	65	60	89	85
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	25	23	78	79	26*	30*	32	23	67	41*	82	72*
6	15	15	87	88	35*	34*	27	25	59	52	79	78
7	14	14	80	96	72	76	30	32	47	49	80	81
8	21	15	80	78	80	60	32	30	67	50	86	84
9	22	23	82	89	75	68	25	26	56	53	86	88
10	24	23	81	90	66	33*	—	—	—	—	—	—
11	25	23	92	91	80	72	46	35	58	58	84	79
Prosjek												
I	20	17	84	87	60	57	34	31	61	53	83	81
II	21	19	—	—	73	68	—	—	—	55	—	82
	—16		—2		—20	(—33)	—11		—26		—10	
	+2		+16		+4		+2		+2		+2	

* Izvan tolerancije za klijavost prema I S T A-i

U tabelarnim pregledima rezultata tetrazol testa i klasičnog načina ispitivanja klijavosti vidimo, da se postoci kreću u granicama propisanih tolerancija, i čak štoviše, rezultati između ispitivanja klijavosti pojedinih ustanova imaju veće međusobne diferencije od rezultata tetrazol testa.

Vlastiti pokusi u Zavodu za ispitivanje sjemena u Zagrebu potvrđuju, premda u manjem broju ispitivanja, podudarnost tetrazol testa klasičnom metodom ispitivanja klijavosti, što se vidi iz slijedeće tabele.

Vrsta sjemena	S o r t a H i b r i d	Anali- tički broj	TT %	% klija- javosti vosti (u pijesku)
Pšenica	Zlatna dolina	4023	92	88 + 6
Pšenica	Zlatna dolina	4024	97	95
Pšenica	Libellula	4030	91	85 + 6
Pšenica	Libellula	4048	97	94
Pšenica	Superzlatna	4343	98	97
Pšenica	Novosadska rana	4353	98	93
Pšenica	Moslavka	4001	96	94
Pšenica	Zlatoklasa	4603	98	96
Pšenica	Bistra	4639	98	95
Pšenica	Baranjka	4725	98	96
			96,3	96
Ječam jari	Pirouette	940	98	95
Ječam jari	Union	941	98	96
Kukuruz	Bc 183	823	98	98
Kukuruz	Bc 183	701	98	96
Kukuruz	Bc 360	854	98	96
Kukuruz	Bc 360	930	97	95
Kukuruz	Bc 420	858	90	87
Kukuruz	Bc 420	859	89	84 + 5
Kukuruz	Bc 66 — 25	881	98	95
Kukuruz	Bc 66 — 25	885	96	93
Kukuruz	Bc 66 — 25	897	82	76
Kukuruz	Bc 418	908	98	97
Kukuruz	Bc 418	909	95	92
Kukuruz	Bc 28 — 11	1310	97	94 + 3
Kukuruz	EDO KWS 701	712	98	98
Kukuruz	FORLA KWS 713	796	98	96
Kukuruz	MUTIN KWS 752	1184	98	97
Talijanski ljulj	B — 9	2890	90	91
Talijanski ljulj	B — 9	3652	74	73
Talijanski ljulj	B — 9	3662	79	79
Talijanski ljulj	B — 9	3664	86	80
Vlasulja livadna	B — 14	2010	95	80 + 15
Vlasulja livadna	B — 14	2011	86	67 + 19
Vlasulja livadna	B — 14	2017	92	86
Vlasulja livadna	B — 14	2018	97	89
Grahorica	Ratarka	4320	95	94
Grahorica	Ratarka	3008	85	77 + 8

Z A K L J U Č A K

Iz svega proizlazi da nema razloga da se tetrazol test ne uvede u redovitu praksu naših laboratorija za ispitivanje sjemena, prvenstveno za sada u informativne svrhe, a čak i za dokumentaciju sjemena žitarica u slučajevima insistiranja na hitnom izdavanju deklaracija.

Dormantnost sjemena žitarica je redovita pojava svake godine kod ispitivanja klijavosti sjemena žitarica proizvedenih u istoj godini, što uobičajenim postupkom u svrhu savladavanja dormantnosti pomoću niskih temperatura produžuje propisano vrijeme ispitivanja za 4—5 dana, dok primjenom tetrazol testa dormantnost ne predstavlja prepreku, i vrijeme ispitivanja traje samo 1 dan umjesto 7 — 12 dana.

Na kraju vrijedno je istaći da su dosadašnja precizna ispitivanja na provjeri tetrazol metode otkrila, da divergentni rezultati pojedinih laboratorija nisu uzrokovani nedostatkom u samoj metodi, već isključivo nepreciznom primjenom i nedosljednim tehničkim postupcima pri izvođenju ove metode.

MIRJANA UJEVIĆ, A. UJEVIĆ

TETRAZOL TEST U KOMPARACIJI S KLASIČNIM METODAMA ISPITIVANJA KLIJAVOSTI SJEMENA

P R I K A Z

Obrađen je povijesni razvoj kemijskih i biokemijskih metoda koje su prethodile otkriću tetrazol-testa (Lakon 1942).

Ovaj metod je primijenjen komparativno uz klasični način ispitivanja klijavosti sjemena: kukuruza, žitarica, trava, djetelina, uljarica i povrtnog bilja. Rezultati ispitivanja su iskazani u tabelama za navedene vrste sjemena.

S A Ž E T A K

Obrađen je povijesni razvoj kemijskih i biokemijskih metoda (Dimitriewicz, 1976; Turina, 1922; Neljubov, 1925; Hasegawa, 1932) koji je prethodio otkriću tetrazol — testa (Lakon, 1942).

Dr Božo Turina je de facto preteča metoda bojenja solima selena i tellura, a Lakonu je uspjelo da ove soli zamijeni tetrazol — solima koje nisu otrovne, a otopina im lakše prodire u klicu.

Tabelarno su iskazani rezultati ispitivanja klijavosti sjemena: žitarica, trava i djetelina, uljarica i povrtnog sjemena po tetrazol — testu i klasičnim ispitivanjem prema metodici ISTA-e. Rezultati ispitivanja upućuju na date zaključke.

Dormantnost žitarica je redovita pojava svake godine kod ispitivanja klijavosti sjemena i razlog je produženju vremena ispitivanja za 4 — 5 dana, međutim primjenom tetrazol — testa vrijeme ispitivanja umjesto 7 — 12 dana klasičnim metodom traje samo 1 dan.

L I T E R A T U R A

1. Bulat H. (1961) Reduktionosvorgange in lebendem Gewebe, Formazane, Teterasoliusalze und ihre Bedeutung als Redoxindikatoren im ruhenden Samen. Proc. Int. Seed. Ass. 26 (4)
2. Eidmann F. E. (1938) Eine neuere biochemische Methode zur Erkennung des Aussaatwertes von Samen. Proc. Int. Seed Test. Ass. 10:203—211.
3. Eidmann F. E. (1938) Die praktische Brauchbarkeit der Selenmethode bei der Saatgutprüfung. Deut. Forstwirt. 20:445—449.
4. Gaad (1950) Biochemical tests for seed germination. Proc. Int. Seed Test. Ass. 16 (2):235—253.
5. Hasegawa K. (1935) On the determination of vitality in seed by reagents. Proc. Int. Seed Test ASS. 7 (2):148—152.
6. Kietreiber M. (1960) Ueber Differenzenzwischen TTC— und Keimfähigkeitswert bei Zea mays. Proc. Int. Seed Test Ass. 27 (1):467—472.
7. Lakon G. (1940) Die Topographische Selenmethode, ein neues Verfahren zur Feststellung der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte ohne Keimversuch. Proc. Int. Seed Test Ass. 12:1—18.
8. Lakon G. (1942) Topographische Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsaize. Ber. Deut. Bot. Ges. 60:299—305.
9. Lakon G. (1942) Topographische Nachweis der Keimfähigkeit von Mais durch Tetrazoliumsaize. Ber. Deut. Bot. Ges. 60:434—444.
10. Lakon G. (1953) Zur Geschichte der »biochemischen« Keimprüfungsmethoden. Saatgut—Wirtsch. 5:180—183, 205—207.
11. Lakon G. (1954) Die Verwendung einer kombinierten Tetrazoliumlösung in der Topographischen Keimprüfung. Saatgut—Wirtsch. 7 (8):207—208. Herbage Abstr. 25 (1):42, 1955).
12. Lindenbein W. (1960) Report of the activities of the tetrazolium test committtee 1959—1962. Proc. Int. Seed Test. Ass. 27:224—224.
13. Lindenbein W. und H. Bulat. (1960) Grundsatzliches zum Tetrazoliumtest. Proc. Int. Seed Test. Ass 25 (1):449—451.

14. Moore R. B. (1961) Tetrazolium evaluation of the relationship between total germination and seed quality. Proc. Ass. Offic. Seed Analysts 51:127—130
15. Moore R. P. (1964) Percentage viability by TZ test vs. total germination percentage. News. Lett. Ass. Off. Seed Analysts. 38 (3):17—18.
16. Moore R. P. (1965) The topographical tetrazolium method. Seed Technol. News. 34 (1):23—24.
17. Neljubow D. N. (1925) Ueber die Methoden der Bestimmung der Keimfahigkeit ohne Keimprufung. Ann D'Essais De Semences. J. D'Institut d'Essais de Semences au Jardin Botanique de Republique a Leningrad 4 (7):14—31. (Russian), und 4 (7):31—35. (German).
18. K. E. Ovčarov (1976) Fiziologija formiravanija i porast-anija sjemjan (236 — 246)