

ПОРЕЂЕЊЕ ТЕТРАЗОЛИУМ ТЕСТА, ТЕСТА ИЗДВОЈЕНОГ ЕМБРИОНА И СТАНДАРДНЕ КЛИЈАВОСТИ КОД СЕМЕНА ВОЋАРСКИХ И ШУМАРСКИХ ВРСТА*

Кратак садржај: *Тетразолиум (ТТЗ) тест представља основни метод за испитивање квалитета воћарских и шумских врста. Брзо добијање резултата ТТЗ тестом (2 дана) у односу на тест клијавости (и до 4 месеца) изузетно је значајно због кратких рокова при увозу и извозу семена. Тетразолиум тест даје вредности потенцијалне клијавости. Вредности стандардне клијавости ће достићи тај потенцијал уколико нема никаквих препрека за клијање (нпр. мировање семена). Циљ овог рада био је утврђивање разлика између потенцијалне и стандардне клијавости код виноградарске брескве, џанарике, багрема, црног бора, смрче и јабуке. Резултати су статистички обрађени и утврђено је да постоје значајне разлике између вредности потенцијалне и стандардне клијавости код испитиваног узорка виноградарске брескве, багрема и смрче. ISTA правила за неке биљне врсте препоручују и тест издвојеног ембриона (ЕЕТ). Овим тестом убрзава се клијање уклањањем спољашњих структура семена. ЕЕТ тест је примењен код брескве, џанарике и дивље јабуке. Добијене вредности ЕЕТ теста нису се статистички значајно разликовале од вредности потенцијалне и стандардне клијавости, осим код виноградарске брескве. Резултати ТТЗ теста показују веће вредности у односу на стандардну клијавост када је семе дормантно и заражено патогенима. У таквим случајевима ЕЕТ тест може бити добра алтернатива.*

Кључне речи: стандардна клијавост, ТТЗ тест, ЕЕТ тест.

* Оригиналан научни рад

¹ Институт за кукуруз “Земун Поље”, Београд

² Институт за заштиту биља и животну средину, Београд

Увод

Тетразолиум тест представља основни метод за испитивање квалитета семена воћарских и шумских врста. Семе воћака, као орган са основном функцијом репродукције, служи у воћарској пракси за производњу генеративних подлога или у селекцијском раду за добијање нових хибрида (Миљковић, 1987).

Џанарика је биљна врста која се у целом свету користи као подлога за калемљење шљиве и других врста из рода *Prunus* (кајсија, бресква, бадем). Дивља јабука такође служи као подлога за калемљење, али и у програмима селекције као извор отпорности на различите патогене и стресове. Најчешћи вид размножавања шумских врста јесте семеном. Самим тим намеће се потреба испитивања квалитета семена дрвенастих врста које се налазе на тржишту, као и усаглашавања метода које се користе у испитивању истих.

Дрвенасте културе умереног климатског подручја карактеришу се дормантношћу семена. Овај механизам омогућава да биљке у раном стадијуму развића избегну неповољне прилике током касне јесени, зиме и раног пролећа. Због наведене особине, испитивање клијавости захтева предтретман хлађења или неки други вид уклањања дормантности. За клијање неких биљних врста потребно је и до 4 месеца. Овако дуг период испитивања у пракси је неприхватљив, па се у лабораторијама за испитивање семена уместо стандардне клијавости испитује потенцијална клијавост ТТЗ тестом.

У ТТЗ тесту безбојни раствор 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида се редукује у присуству групе ензима дехидрогеназа, у виталним деловима семена, и формира се стабилан, нерастворљив 2,3,5-трифенилформазан црвене боје (ISTA, 2005).

Тест клијавости и ТТЗ тест одређују различите особине семена. ТТЗ тест даје вредност потенцијалне клијавости. Вредност стандардне клијавости ће достићи тај потенцијал уколико нема никаквих препрека за клијање, као што је, на пример, било који вид мировања семена. ТТЗ тест се примењује преко 60 година. У ISTA (2005) и AOSA (2000) правилима налазе се процедуре за преко 100 врста пољопривредног биља. У *Правилнику о нормама квалитета и другим условима за стављање у промет шумског семена* (СФРЈ, 1968) дате су вредности минималне чистоће и клијавости, али не и потенцијалне клијавости. У промету шумског семена може доћи до

нејасноћа и неспоразума по питању минималних захтева које шумско семе мора да испуни.

Циљ овог рада био је да се утврде разлике између вредности стандардне и потенцијалне клијавости код виноградарске брескве (*Prunus persica ssp. vulgaris*), џанарике (*Prunus cerasus*), багрема (*Robinia pseudoacacia*), црног бора (*Pinus nigra*), смрче (*Picea abies*) и дивље јабуке (*Malus sylvestris*). Упоредо је испитана могућност примене ЕЕТ теста који се препоручује за испитивање семена из рода *Prunus* и *Malus*.

Материјал и методе рада

За истраживања су коришћени узорци семена виноградарске брескве, џанарике, дивље јабуке, багрема, смрче и црног бора.

Стандардна клијавост испитана је према ISTA правилима (2003а). Клијање џанарике, виноградарске брескве и јабуке изведено је уз претходно хлађење на температури 3 - 5°C у трајању од 3 месеца, а затим је семе изложено оптималним условима (20/30°C у трајању 16/8 h). Семе је хлађено између навлаженог филтер папира, а потом наклијавано у песку. Укупна клијавост оцењена је након 28 дана клијања под оптималним условима.

Семе црног бора и смрче наклијавано је на филтер папиру, на температури 20/30°C, а укупна клијавост оцењена је после две недеље.

Семењача багрема прво је пробијена у пределу котиледона насупрот клице, семе је потопљено у воду 3 h и наклијавано на филтер папиру 14 дана у клијалишту, са наизменичном температуром 20/30°C.

Потенцијална (ТТЗ) клијавост за џанарику, виноградарску брескву и јабуку обухвата следеће поступке: издвајање семена из коштице, бубрење семена у води 18h, одстрањивање семењаче и бојење у 1% раствору 18 сати на 30°C у мраку. Максимално дозвољене необојене површине код џанарике и брескве, да би семе било квалификовано као витално, јесу: врх радикуле и 1/3 површинских некроза котиледона. Код јабуке су дозвољене следеће необојене површине: врх радикуле, 1/3 котиледона или 1/2 површинских некроза котиледона.

Потенцијална клијавост црног бора испитана је по модификованој процедури из ISTA правила. Семе је бубрено 18h, а након уклањања семењаче бојено 18h у 1% раствору тетразолиум-хлорида. Као витално семе класификовано је потпуно обојено семе, а толерисале су се мале површинске некрозе спољашњег дела ендосперма.

Истим поступком испитано је семе смрче, што је модификација описаног поступка у ISTA приручнику за ТТЗ (ISTA, 2003b). Процедура за смрчу и багрем још увек се налази у ISTA правилима, јер тест клијавости не представља потешкоћу и резултати се добијају релативно брзо. Код багрема, након бубрења семена 18h, директно је уследило бојење 18h у 1% ТТЗ раствору на 30°C. Семењача је уклањана непосредно пре оцене виталности. После бубрења тврдом семену је пробијена семењача у пределу насупрот клице, накнадно бубрено и затим бојено. Витално семе може имати необојен врх радикуле и $\frac{1}{2}$ некротиране површине котиледона насупрот клице.

Тест издвојеног ембриона (ЕЕТ) препоручује се за врсте из рода *Prunus* и *Malus*. Код виноградарске брескве, џанарике и дивље јабуке уклоњена је коштица и семењача, издвојени ембриони испирани су са 5% натријум-хлоридом и затим наклијавани на филтер папиру 14 дана на 20°C, са осветљењем минимум 8h. Болесни ембриони су свакодневно уклањани.

Статистичка анализа добијених резултата урађена је по моделу једнофакторијалне анализе варијансе за сваку биљну врсту посебно. У свим подацима претходно је примењена трансформација $\arcsin \sqrt{\%}$.

Резултати и дискусија

Вредности потенцијалне и стандарне клијавости показале су се као статистички значајно различите код виноградарске брескве, смрче и багрема 2 (табела 1).

Разлике између примењених метода биле су најочигледније код виноградарске брескве. Потенцијална клијавост утврђена ТТЗ тестом износила је 77%, док је стандардна клијавост била само 20%.

У стандардном тесту клијавости присутно је било једно мртво/болесно семе и један ненормалан клијанац (табела 2). Просечно 78% семена класификовано је као неклијало. То семе је испољавало дормантност, а могући узрок је чврста, непропустљива коштица (ендокарп).

Табела 1. Вредности теста клијавости, тетразолиум теста (ТТЗ) и теста издвојеног ембриона (ЕЕТ) код семена дрвенастих врста
Values of tree seed germination test, tetrazolium test (TTZ) and excised embryo test (EET)

Врста Species	Клијавост (%) Germination (%)	ТТЗ(%) TTZ(%)	ЕЕТ(%) EET(%)
Виноградарска бресква Vineyard peach	20 ^c	77 ^a	59 ^b
Цанарика Cherry plum	82 ^a	82 ^a	86 ^a
Багрем 1 False acacia 1	80 ^a	91 ^a	/
Багрем 2 False acacia 2	77 ^b	95 ^a	/
Црни бор Austrian pine	87 ^a	89 ^a	/
Смрча Common spruce	61 ^b	91 ^a	/
Дивља јабука Wild apple	1 ^a	19 ^a	9 ^a

Вредности у истом реду, обележене истим малим словом, статистички се значајно не разликују на нивоу значајности $\alpha = 0,05\%$

Дормантност семена је феномен у биљном свету који још увек није расветљен. Установљено је да чврст ендокарп код коштичавог воћа може само донекле да успори клијање, али није основни узрок дормантности. Узрок пуцања ендокарпа заправо је раст корена ембриона. Претпоставља се да престанак деловања фактора дормантности изазива пуцање ендокарпа, а не обрнуто (Nikolaeva, 1969).

Tabela 2. *Резултати стандардне клијавости виноградарске брескве, џанарике и смрче*
Results of standard germination test on Vineyard peach, Cherry plum, and Common spruce

Врста Species	Нормални клијанци Normal seedlings	Ненормални клијанци Abnormal seedlings	Мртво семе Dead seed	Неклијало семе Ungerminated seed
Виноградарска бресква Vineyard peach	20	1	1	78
Џанарика Cherry plum	82	1	0	17
Смрча Common spruce	61	2	27	10

Објашњење везано за две различите особине семена (потенцијална и стандардна клијавост) постаје још компликованије када се разматрају резултати теста издвојеног ембриона. Просечно 59% издвојених ембриона класификовано је као витално, што је значајно мање од вредности ТТЗ теста (77%). Узрок томе могао би бити тај што се у ТТЗ тесту, за разлику од ЕЕТ теста, не детектују болесна семена. То би могла бити значајна предност у односу и на стандардну клијавост и на ТТЗ тест.

Резултати испитивања семена џанарике другачији су у поређењу са виноградарском бресквом, иако се и овде појављује дрвенасти ендокарп. Добијене су идентичне вредности клијавости и виталности (табела 1), што указује да је потенцијал семена у потпуности остварен. Процес клијања несметано се одвија дајући 82% нормалних клијанаца. ТТЗ тестом је потврђен однос између виталних и невиталних семена. Седамнаест семена није клијало у испитивању клијавости (табела 2), а закључено је да она нису била дормантна, већ штура и болесна. Могуће је, такође, да су семена била празна, али то није испитано.

Тест издвојеног ембриона код џанарике дао је нешто већу вредност (86%), али оне нису биле статистички значајне у поређењу са стандардном клијавошћу и виталношћу.

Значајне разлике између вредности стандардне и потенцијалне клијавости појавиле су се и код смрче. Просечна клијавост износила је 61%, док је виталност била 91% (табела 1). Претпоставка да постоји 30% семена које је дормантно не би била

исправна, јер је у тесту клијавости било само 10% неклијалог семена (табела 2). Негативна карактеристика ТТЗ теста је немогућност детекције болесног семена (*Moore*, 1985; *Stainer i Kruse*, 1999), што се и у овом раду показало (табела 1 и 2).

Тврда семењача багрема може изазвати дормантност семена. Међутим, приликом испитивања семењача је пробијена пре наклијавања, тј. бубрења семена за ТТЗ тест. Значајне разлике које су се појавиле између стандардне клијавости и ТТЗ теста код узорка семена багрема 2 (табела 1) могу се, такође, приписати дејству патогена. Ако се 13% болесног семена дода вредности клијавости (77%) добије се приближна вредност потенцијалне клијавости.

Код семена багрема 1 број болесних семена износио је 5%, па се разлике које су постојале између потенцијалне и стандардне клијавости нису показале као статистички значајне.

Вредности ТТЗ теста и теста стандардне клијавости код семена црног бора биле су јако блиске и нису биле статистички значајне.

Код јабуке је био присутан велики број невиталног семена са различитим некрозама. Просечно 19% семена класификовано је као витално, иако је само једно дало нормалан клијанац у стандардном тесту клијавости (табела 1), што се опет може објаснити присуством патогена. Као и код виноградарске брескве, ЕЕТ тест је дао резултате између вредности ТТЗ теста и стандардне клијавости.

Резултати рада указују да ЕЕТ тест може успешно да се користи у испитивању квалитета семена воћарских врста. Поступак издвајања је идентичан као код ТТЗ теста, али је потребан период клијања од 14 дана у поређењу са 18 h за ТТЗ тест, што може представљати недостатак. *McDonald* (2001) истиче да је велики недостатак ЕЕТ теста време потребно за издвајање ембриона, обука особља које изводи тест, као и примена теста код ситног семена због тешког издвајања ембриона.

Закључак

Вредности потенцијалне и стандардне клијавости показале су се као значајно различите код виноградарске брескве, смрче и багрема 2.

Главни узроци насталих разлика били су дормантност семена код виноградарске брескве и присуство болесног семена код смрче и багрема 2.

Тест издвојеног ембриона, иако захтева дуже време испитивања, може представљати алтернативу ТТЗ тесту јер се при испитивању може детектовати присуство патогена на семену.

Литература

1. AOSA (2000a): *Rules for testing seeds*. Journal of Seed Technology, 16 (3), 1-126.

2. AOSA (2000b): *Tetrazolium testing handbook, revision 2000*. Assotiation of Official Seed Analysts, Linkoln, NE.

3. ISTA (2003a): *International Rules for Seed Testing, edition 2003*. International Seed testing Assotiation, Basserdorf, CH.

4. ISTA (2003b): *ISTA working sheets on tetrazolium testing. Volume II, Tree and shrub species*. International Seed testing Assotiation, 1 st edition, Basserdorf, CH.

5. ISTA (2005): *International Rules for Seed Testing, edition 2005*. International Seed testing Assotiation, Basserdorf, CH.

6. McDonald (2001): *Seed viability tests*. In: Seed technology training manual (eds. M.B. McDonald, T. Gutormson, and B. Turnipseed). Pp. 10-10.18. Society of commercial Seed Technologists, Ithaca, NY:

7. Миљковић, И. (1987): *Биолошке особине сјемепа воћака и значење генеративног размножавања у воћарској зпаности и пракси*. Семенаpство, 4-6, 243-259.

8. Moore (1985): *Handbook of tetrazolium testing*, ISTA Secretariat, P.O.Box 412, CH-8046, Zurich, Switzerland.

9. Nikolaeva (1969): *Physiology of deep dormancy in seeds*. Izdateljstvo »Nauka«, Leningrad. (Translated from Russian by Z. Shapiro. National Science Foundation, Washington D.C.)

10. Službeni list SFRJ 45/68 (1968): *Pravilnik o normama kvaliteta i drugim uslovima za stavljanje u promet šumskog semena i o jedinstvenoj metodi za vršenje analize šumskog semena*.

11. Steiner, A.M., Kruse, M. and Fuchs, H. (1999): *A re-assessment of the comparison of tetrazolium viability testing and germination testing*. Seed Science Technology, 27, 59-65.

Примљено: 15.07.2005.

Редиговано: 18.07.2005.

COMPARISON OF TETRAZOLIUM, EXISED EMBRYO AND STANDARD GERMINATION TEST AT FRUIT AND FOREST TREE SEEDS

Milivojević M., Poštić D.

UDC: 631.547.1

Summary

The tetrazolium test, (TTZ) , is a fundamental method for quality testing of fruit and forest tree seeds. Results obtained by TTZ test could be in two days compared to the standard germination test that results could be in four monts. Obtaining these results quickly is extremely significant in short deadlines for seed export and import. The TTZ test provides the values of potential germination. Values of standard germination will achieve its potential if there are no any obstacle for germination (seed dormancy). The aim of this paper was to determine the differences between potential and standard germination in vineyard peach , cherry plum, false acacia, Austrian pine, common spruce and wild apple. The test were conducted according to ISTA Rules (2003). The results were statistically analised and significant differences between potential and standard germination were detected in vineyard peach, false acacia and common spruce. An excised embryo test (EET) is also recommended by the ISTA Rules for some species. This test allow increase the speed germination by eliminating the seed coat structures. It was applied in peach, cherry plum and wild apple. Results that are got by EET test were not differ significantly from the potential and standard germination unless for vineyard peach. Results that are got it by TTZ test show heihger values to standard germination when seed is dormancy and infected. In those situation EET test could be a good alternative.

Key words: Standard germination, tetrazolium test, excised embio test

Author's address:
Marija Milivojević, dipl. ing.
Institut za kukuruz, Zemun polje
S.Bajića 1, 11185 Zemun Polje

Received: 15.7.2005.

Accepted: 18.7.2005.