

ERÄIDEN HITAASTI ITÄVIEN SIEMENIEN ITÄVYYDEN MÄÄRITYKSESTÄ TETRAZOLIUM-MENETELMÄLLÄ

ERKKI AHLBERG

Valtion siementarkastuslaitos, Helsinki

Saapunut 4. 4. 1957

Seuraavassa selostetaan valtion siementarkastuslaitoksessa suoritettuja kansainvälisen siementarkastusliiton (I.S.T.A.) toimeenpanemaan tutkimukseen liittyviä vertailevia kokeita. Niiden tarkoituksena on selvittää värjäysmenetelmän soveltuvuutta eräiden sellaisten hitaasti itävien siemienien itävyyden määrittämiseen, joiden itävyyden toteaminen tavallisilla korsiviljojen siementen idätysmenetelmillä on antanut epätydyttäviä tuloksia.

Värjäysmenetelmä on osoittautunut korsiviljojen siementen itävyyden määrittämisessä useiden tutkimusten mukaan (2, 4, 5, 8) epätydyttäväksi ja käytäntöön vaikeasti sovellettavaksi. Tätä menetelmää onkin nykyisin keskitytty soveltamaan vain eräiden vaikeasti idätettävien siementen itävyyden selvittämiseen.

Selostettavaa työtä varten lähetti Wienin siementarkastuslaitoksen edustaja, tohtori HERMANN GERM, vuoden 1954 alussa siennäytteitä yhdeksään maahan, kymmeneen eri siementarkastuslaitokseen. Lähetys käsitti kymmenen siemenerää, joihin sisältyi 6 siemenlajia. Näytteiden itävyyden tarkastusohjeet seurasivat mukana.

Kasvilajit (ks. taul. s. 144), joiden siemeniä tutkittiin, olivat seuraavat: *Carpinus betulus* L. (näyte 1), *Fraxinus excelsior* L. (näytteet 2 ja 3), *Prunus Myrobalana* L. (näytteet 4 ja 5), *Pirus communis* L. (näytteet 6 ja 7), *Rosa canina* L. (näyte 8) ja *Tilia grandifolia* Ehrhart (näytteet 9 ja 10). Kansainvälisen siementarkastusliiton nykyisten sääntöjen (7) mukaan tetrazolium-menetelmää voidaan käyttää kaikkien em. kasvilajien siementen itävyyden määrittämiseen.

Tutkimusmenetelmät

Lähetetyt tutkimusohjeet olivat seuraavat:

Koesarja I. Itävyystudkimus ilman edeltävää kylmäkäsittelyä. Siemenet idätettävä imupaperi- tai hiekka-alustalla 20—25° C:n lämpötilassa. Mahdolliset muut menetelmät.

Eräiden hitaasti itävien siemienien itävyys.
Die Keimfähigkeit einiger langsam keimenden Samen.

Näyte Probe N:o	Laji Art	Koesarja I		Koesarja II		Koesarja III					
		Idätykokeet ilman kylmäkäsitelyä Keimversuche ohne Kältebehandlung		Idätykokeet kylmäkäsitellyineen Keimversuche mit Kältebehandlung		Tetrazoliumkoe Tetrazoliumversuch					
		Idätyks Keimung beginn am	Idätyks päätyi Keimung beendet am	Itäneitä + itämät- tömiä terveitä siemeniä % Gekeimte + unge- keimte gesunde Samen %	Valtion siementarkastus- laitoksen kokeet Versuche in der staatlichen Samenkontrollanstalt.	Kaikkien laitosten keskimää- räiset ar- vot ¹⁾ Mittel- werte aller Anstalten ¹⁾	Itävyys % Keimfähigkeit %	Näytteiden toden- näköinen itävyys % ¹⁾ Wahrschein- liche Keim- fähigkeit % ¹⁾			
1.	Carpinus betulus (1953)	22. 3. 1954	8. 7. 1954	0 + 55	0 + 64.6	6	30	55 ²⁾	54	54.3	55—65
2.	Fraxinus excelsior (1952)	»	»	0 + 76	74, 73 ³⁾	—	45	68.3 ²⁾	69	69.6	68—74
3.	» (1953)	»	»	0 + 88	77, 76 ³⁾	—	46	79.3 ²⁾	81	81.7	76—79
4.	Prunus myroba- lana (1952)	17. 3. 1954	19. 6. 1954	—	36.4 ²⁾	33	64	31 + 66	84	94.1	95—97
5.	» (1953)	»	»	—	55 ²⁾	55	74	96 ²⁾	87	96.0	96
6.	Pirus communis (1952)	1. 4. 1954	10. 7. 1954	20 + 0	6 + 2	8	18	13.2 + 2.4	10	21.8	25
7.	» (1953)	31. 3. 1954	»	46 + 0	44 + 0	23	65	65 ²⁾	64	74.0	62—78
8.	Rosa canina (1953)	15. 3. 1954	9. 7. 1954	0 + 69	0 + 69.3	—	1	—	70	69.2	69
9.	Tilia grandifolia (1952)	»	»	0 + 81	0 + 86.7	—	2	—	76	85.5	87
10.	» (1953)	»	»	0 + 92	0 + 89	—	3	—	86	88.9	89

¹⁾ GERMIN (6) mukaan.

²⁾ Nach GERM (6).

³⁾ Itäneiden ja itämättömien terveitten siemienien yhteenlaskettu lukumäärä.

Die Anzahl der gekeimten und der ungekeimten gesunden Samen ist zusammengerechnet angegeben.

⁴⁾ Idätyksen päätyttyä siementen terveyttä tutkittaessa todettu alkioiden kasvaneen ennen näkyvää itämävaihetta (kahden siementarkastuslaitoksen ilmoittamat määrät).

Koesarja II. Itävyystutkimus kylmäkäsittelemällä siemenet muutaman viikon, korkeintaan kolmen kuukauden ajan sekä sen jälkeen idätys korkeammassa lämpötilassa.

Koesarja III. Tetrazolium-värjäyskoe. Tämän suorittamista varten oli lähetetty ohjeet kutakin siemenlajia varten erikseen. Näitä tutkimusohjeita on BULAT selostanut julkaisussaan v. 1956 (3).

Valtion siementarkastuslaitoksessa tapahtui eri koesarjojen siemienien kokeileminen seuraavasti (vrt. taul.):

Koesarja I. Lajeista *Carpinus betulus* (näyte 1), *Fraxinus excelsior* (näytteet 2 ja 3), *Prunus myrobalana* (näytteet 4 ja 5), *Rosa canina* (näyte 8) ja *Tilia grandifolia* (näytteet 9 ja 10) idätettiin 4×100 siementä hiekka-alustalla, pimeässä, n. $20-25^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. *Fraxinus excelsior*-näytteiden siemenet kylmäkäsiteltiin aluksi 87 vrk:n ajan. Lämpötila oli ensimmäisen kuukauden aikana $3-6^{\circ}\text{C}$, toisen kuukauden aikana $5-11^{\circ}\text{C}$ ja kolmannen kuukauden aikana $9.5-13.5^{\circ}\text{C}$. *Prunus myrobalanan* siemenistä poistettiin kova luukerros ennen idättämistä. *Pirus communis*-näytteiden siemenet (näytteet 6 ja 7) idätettiin nk. Jacol'ssenin idätysaltaassa, valossa, $20-30^{\circ}\text{C}$:n vaihtolämmössä (18 t 20°C ja 6 t 30°C). Siemenet kuorittiin ja haavoitettiin 36 (näyte 6) ja 37 vrk:n (näyte 7) kuluttua idätyksen alkamisesta.

Koesarja II. Näytteistä pantiin 5×100 siementä itämään lehtimullan sekaiseen hiekkaan ja idätysastiat vietiin kylmään kellariin pimeään. Lämpötila oli kellarissa ensimmäisen kuukauden aikana $3-6^{\circ}\text{C}$, toisen kuukauden aikana $5-11^{\circ}\text{C}$ ja kolmannen kuukauden aikana $9.5-13.5^{\circ}\text{C}$. Tämän jälkeen idätysastiat siirrettiin n. 16°C :n lämpötilaan. Varsinaisen koeajan jälkeen, lokakuun 10 p:nä, idätysastiat siirrettiin takaisin kellariin, jonka alhaisin mitattu lämpötila oli loka-maaliskuun aikana -4°C ja korkein lämpötila $+10^{\circ}\text{C}$. Tämän kylmäkäsitteilyn jälkeen näytteet siirrettiin n. 16°C :n lämpötilaan.

Koesarja III. Värjäyskokeet suoritettiin keväällä v. 1954. *Prunus myrobalana*-näytteiden siementen itämiskyky tutkittiin 2×100 siemenestä, muiden 3×100 siemenestä.

Värjäys ja arvostelu tapahtuivat seuraavasti:¹

Carpinus betulus ja *Rosa canina*. Ensiksimainitun pähkylät ja jälkimmäisen siemenet turvotettiin yön ajan huoneenlämpöisessä vedessä, jonka jälkeen niiden leveämmästä päästä katkaistiin n. $1/4-1/3$ ja pantiin 1 %:een värjäysliuokseen²) $+30^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan 24 tunnin ajaksi. Alkiot irroitettiin neulalla. Niiden siementen lisäksi, joiden alkiio oli täysin värjäytynyt, katsottiin itämiskykyisiksi myös siemenet, joiden alkiujuuren kärki tai vähäiset osat alkiujuurta vastapäisessä sirkka-lehtien osassa olivat värittömiä.

Fraxinus excelsior. Siemenkuori poistettiin ja siemenet turvotettiin vedessä yön ajan, jonka jälkeen siementen kummastakin päästä leikattiin pois n. 1 mm. Sitten ne värjättiin 24 tunnin ajan $+30^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Tämän jälkeen siemenet

¹) Värjäystulos on arvosteltu GERMin kirjeellisesti antamien ohjeiden mukaisesti.

²) Myös muiden lajien siementen värjäykseen käytettiin samanlaista liuosta (2,3,5-trifenyltetrazoliumkloridi-valmiste, nimeltä Tetrazol. Valmistaja: Bayer-Werke, Leverkusen).

halkaistiin siten, että alkio paljastui. Itämiskykyisiksi katsottiin siemenet, joissa siemenvalkuainen oli joko täysin värjäytynyt tai oli siinä vain vähäisiä pinnallisia värjäytymättömiä kohtia. Alkion tuli olla kokonaan värjäytynyt. Väri ilmeni kuitenkin niin heikkona, ettei sen perusteella katsottu voitavan tehdä siemenen itävyydestä riittävän varmoja johtopäätöksiä.

Prunus myrobalana. Siemeniä ympäröivä luu rikottiin, jonka jälkeen siemenet pantiin yön ajaksi turpoamaan huoneenlämpöiseen veteen. Tämän jälkeen poistettiin kuori sekä siemenvalkuainen. Sitten siemenet värjättiin 20 tunnin ajan $+30^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa. Niiden siementen lisäksi, joiden alkio oli täysin värjäytynyt, katsottiin itämiskykyisiksi myös sellaiset siemenet, joiden alkiojuuren kärki oli värjäytymätön ja alkiojuurta vastapäisessä sirkkalehtien kärkiosassa esiintyi vähäisiä värjäytymättömiä kohtia.

Pirus communis. Siemenet turvotettiin yön ajan huoneenlämpöisessä vedessä, poistettiin kuori, ohut sisempi kalvo sekä siemenvalkuainen, jonka jälkeen siemenet pantiin värjäysliuokseen n. 20 tunnin ajaksi $+30^{\circ}\text{C}$:n lämpötilaan. Niiden siementen lisäksi, joiden alkio oli täysin värjäytynyt, katsottiin itämiskykyisiksi myös siemenet, joiden alkiojuuren kärkiosa oli värjäytymätön ja alkiojuurta vastapäisessä sirkkalehtien kärkiosassa esiintyi pieniä värjäytymättömiä kohtia.

Tilia grandifolia. Hedelmän kuori poistettiin, siemeniä turvotettiin yön ajan, jonka jälkeen poistettiin siemenkuori. Värjäysaika oli 24 tuntia $+30^{\circ}\text{C}$:ssa. Siemenet avattiin siten, että alkio paljastui. Itämiskykyisiksi katsottiin siemenet, joiden alkio ja siemenvalkuainen olivat kokonaan värjäytyneet sekä myös sellaiset, joiden siemenvalkuaisessa esiintyi vähäisiä pinnallisia värjäytymättömiä kohtia. Tässäkin tapauksessa väri ilmeni niin heikkona, että varmojen päätelmien teko oli vaikeata.

Tulokset

Kokeiden tulokset nähdään oheisesta taulukosta, johon on kunkin koesarjan kohdalle sijoitettu myös GERMIN (6) julkaisemat, kaikilla siementarkastuslaitoksilla, samoilla siemenillä suoritetuista kokeista saatujen tulosten keskimääräiset arvot. Taulukon viimeisessä sarakkeessa ovat GERMIN yhteenvetona esittämät arvot, joiden hän katsoo likimäärin vastaavan näytteiden todellista itämiskykyä. Tulosten suhteen todettiin seuraavaa:

Carpinus betulus-näytteen värjäyskokeen tulos on yhdenmukainen keskimääräisten koetulosten ja idätyskokeen tulosten kanssa.

Kummankin tutkitun *Fraxinus excelsior*-siemennäytteen tuloksen voidaan katsoa tyydyttävästi vastaavan näytteiden todellista itämiskykyä.

Molempien kokeiltavain *Prunus myrobalana*-näytteiden tulokset poikkeavat sen sijaan huomattavasti vastaavista keskimääräisistä tuloksista. Todennäköinen syy poikkeamiin on, että siementä ympäröivää luuta rikottaessa oli syntynyt vioitumia, jotka jäivät värjäytymättä ja siten terveitä siemeniä joutui lasketuksi kuolleitten ryhmään.

Toisen *Pirus communis*-näytteen itämiskyky näytti olevan hieman parempi kuin värjäyskokeella saadun tuloksen perusteella olisi ollut odotettavissa.

Rosa canina-näytteen tulos on keskimääräisten koetulosten kanssa yhdenmukainen.

Toisessa kokeiltavassa *Tilia grandifolia*-näytteessä jäi tulos keskimääräisiä koetuloksia hieman heikommaksi.

Tavallista idätystapaa käyttäen saatiin itämään vain *Pirus communiksen* siemenet, nekin vain edeltävän pitkäaikaisen kylmäkäsittelyn jälkeen.

Kylmäkäsittely tehoi *Carpinus betuluksen*, *Fraxinus excelsiorin* ja *Prunus myrobalanan* siemeniin vain osaksi, kun taas *Rosa caninan* ja *Tilia grandifolian* siemeniin se käytännöllisesti katsoen ei vaikuttanut lainkaan.

Pirus communiksen siementen itämisaika lyheni kun ne kuorittiin ja haavoitettiin n. kuukauden kuluttua idätyksen alkamisesta. Tulokset viittaavat kuitenkin siihen, että menetelmä on myös tällöin liian epävarma.

Kaikkien kokeissa olleiden lajien siementen itämiskykyä voidaan jossakin määrin selvittää myös siten, että siemenet kuoritaan ja niiden eri osien terveys silmävaraisesti tarkastetaan veitsellä avatuista siemenistä; samalla saadaan selville mahdollisesti esiintyvien tyhjien siementen määrä. Hitaasti itävien siementen itämiskykyä on ruvettukin tutkimaan edellä selostetulla tavalla. Menetelmän varjopuolena on kuitenkin sen hitaus, sillä siemeniä on pidettävä kostealla idätysalustalla riittävän kauvan, tavallisesti muutaman viikon ajan, jotta lievästikin vioittuneissa siemenissä esiintyvät kuolleet solukot pehmenevät niin paljon, että ne voidaan veitsellä leikattaessa silmävaraisesti todeta. Vioittumattomat siemenet pysyvätkin yleensä täysin terveen näköisinä. (Vrt. 1, p. 92.)

Värjäysmenetelmän etuna on, että siemenet tarvitsevat verraten lyhyen turvotusajan ennen värjäystä, joten sitä voidaan edellä selostettuun tarkastustapaan verrattuna pitää edistysaskeleena. Tetrazolium-menetelmän luotettavuudesta ei voitu tehdä varmoja päätelmiä, sillä näytemäärä oli vähäinen ja kokeissa olleista näytteistä vain *Pirus* siemenillä suoritettujen idätykset johtivat positiiviseen tulokseen. Kokeiden tulokset viittaavat kuitenkin siihen, että menetelmällä, varsinkin jos sitä edelleen kehitetään, voidaan päästä siementen itämiskyvyn arvo- telussa suurempaan yhdenmukaisuuteen kuin tutkittaessa siemenet ilman värjäystä. Värjäysmenetelmän kehittämiseksi olisi tärkeätä, että saataisiin kehitetyksi menetelmät, joilla siemenet saadaan itämään, sillä värjäysmenetelmällä saatujen tulosten luotettavuudesta voidaan vain siinä tapauksessa tehdä varmoja johtopäätöksiä, kun tulos on tarkistettavissa todellisen idätystuloksen perusteella.

P ä ä t e l m i ä

Valtion siementarkastuslaitoksessa on tutkittu eräiden hitaasti itävien siementen itävyyttä. Kokeet liittyivät kansainvälisen siementarkastusliiton (I.S.T.A.) biokemiallisten itävyyden määrittämissä menetelmien käyttömahdollisuuksia selvittävän komitean järjestämään tutkimukseen.

Tutkimukset suoritettiin kuuden kasvilajin siemenillä. Näistä ainoastaan *Pirus communiksen* siemenet itivät tavallista idätysmenetelmää käytettäessä, nekin vain pitkäaikaisen kylmäkäsittelyn jälkeen.

Kaikkien tutkittavina olleiden kasvilajien siementen itämiskyvystä voidaan kuitenkin saada jossain määrin tietoa, kun siemenet kuoritaan ja paloitellaan ja tämän jälkeen solukkojen terveyden tilaa tarkastetaan silmävaraisesti.

Tetrazolium-menetelmän etuna pelkkään silmävaraiseen tarkastukseen verrattuna on, että tarkastuksen suoritusta varten riittää verraten lyhyt siementen turvotusaika. Näyttää ilmeiseltä, että tetrazolium-menetelmällä voidaan päästä kokeiltavina olleiden kasvilajien siementen itämiskyvyn arvostelussa suurempaan yhdenmukaisuuteen kuin tutkittaessa siemenet ilman värjäystä.

Värjäysmenetelmän kehittämisessä olisi tärkeätä, että saataisiin kehitetyksi sellaiset menetelmät, joilla kulloinkin tutkittavina olevista siemenistä voitaisiin saada idätystulos, sillä värjäysmenetelmällä saatujen tulosten luotettavuudesta voidaan vain siinä tapauksessa tehdä varmoja johtopäätöksiä, kun tulos on tarkistettavissa todellisen idätystuloksen perusteella.

KIRJALLISUUTTA

- (1) AALTO-SETÄLÄ, J. E. 1931. Itämiskypsymättömien siementen idättäminen ja arvostelu. *Maatal. tiet. aikak.* 3: 91—103.
- (2) AHLBERG, E. 1954. Korsiviljojen itävyyden pikamääritys. *Ibid.* 26: 96—111.
- (3) BULAT, H. 1956. Test instructions according to the Lakon topographical tetrazolium-method for determining germinating capacity of tree seeds. XI. Intern. Seed Test. Congr. June, 1956. Preprint 3, 4 p.
- (4) GADD, I. 1953. Report of the biochemical and seedling vigour test committee. X. Intern. Seed Test. Congr. May, 1953. Preprint 2, 16 p.
- (5) — & KJAER, A. 1940. Über die Verwendbarkeit der Selen- und Indigokarminmethoden bei der Prüfung von Frost- und Fusariumgeschädigtem Getreide. *Proc. Intern. Seed Test. Assoc.* 12: 140—149.
- (6) GERM, H. 1956. Report of the biochemical viability test committee. XI. Intern. Seed Test. Congr. June, 1956. Preprint 15, 19 p.
- (7) International rules for seed testing. *Proc. Intern. Seed Test. Assoc.* 1956, 21: 1—80.
- (8) VERHEY, Ir. C. 1956. Die Unbrauchbarkeit des Tetrazoliumverfahrens zur Prüfung vom durch Trocknung verletzten Saatgut. XI. Intern. Seed Test. Congr. June, 1956. Preprint 12, 4 p.

REFERAT:

ÜBER DIE BESTIMMUNG DER KEIMFÄHIGKEIT EINIGER LANGSAM KEIMENDEN SAMEN DURCH DAS TETRAZOLIUMVERFAHREN

E. O. AHLBERG

Staatliche Samenkontrollanstalt, Helsinki

In der Untersuchung sind in der staatlichen Samenkontrollanstalt ausgeführte vergleichende Versuche mit einigen langsam keimenden Samenarten behandelt worden. Die Versuche gehören zu der

Forschungsarbeit, die veranstaltet worden ist von dem Komitee des internationalen Samenkontrollverbandes (I.S.T.A.), das die Anwendungsmöglichkeiten biochemischer Methoden zur Bestimmung der Keimfähigkeit erhellt.

Von den untersuchten Samen (s. Tabelle) liess sich bei der Art *Pirus communis* unter Anwendung des gewöhnlichen Keimverfahrens ein positives Ergebnis erzielen. Der Samen bedarf jedoch zum Keimen einer lange dauernden Kältebehandlung.

Das Keimen des Samens von *Pirus communis* liess sich schneller dadurch zustande bringen, dass der Samen etwa einen Monat nach Beginn des Keimens geschält und verwundet wurde. Doch ist das Verfahren unsicher.

Über die Keimfähigkeit der Samen aller zur Untersuchung vorgenommenen Arten lässt sich aber in gewissem Masse durch Untersuchung ihrer Gesundheit angeschälten und zerstückelten Samen nur mit Okularinspektion Kenntniss gewinnen.

Der Vorteil des Tetrazoliumverfahrens gegenüber der inneren Prüfung der Samen besteht darin, dass für die Ausführung des Färbens eine verhältnismässig kurze Zeit des Aufquellens der Samen genügt. Es scheint offenbar, dass man unter Anwendung des Tetrazoliumverfahrens bei Beurteilung der Keimfähigkeit der Samen der in die Versuche einbezogenen Arten zu grösserer Übereinstimmung als bei der Samenuntersuchung ohne Färbung gelangt. Für das Entwickeln eines Färbverfahrens wäre es wichtig, dass solche Methoden ausgebildet werden könnten, durch die sich Keimergebnisse gewinnen liessen, denn über die Zuverlässigkeit der durch die Färbmethode erhaltenen Ergebnisse können nur in dem Falle sichere Schlüsse gezogen werden, wenn das Resultat auf Grund eines wirklichen Keimergebnisses zu präzisieren ist.
