

IV. CERCETĂRI PRIVIND FOLOSIREA SĂRURILOR DE TETRAZOLIU LA DETERMINAREA CALITĂȚII SEMINȚELOR

Dr. ing. VIOLETA ENESCU

în colaborare cu

ing. Z. DOBRESCU, ing. L. VOINESCU,

ing. A. MIHALACHE, ing. N. BADEA,

ing. A. CONSTANTIN

A INTRODUCERE

Din punct de vedere istoric, se poate considera că folosirea sărurilor de tetrazoliu la analiza semințelor a fost direct legată de definiția noțiunii de potență germinativă dată de Lakon în 1918. În 1928 *Lakon* prezice posibilitatea determinării cantitative a potenței germinative, iar în 1939, lucrând cu indicatori de oxireducere a clasificat semințele viabile și pe cele care și-au pierdut viabilitatea, prin observarea țesuturilor vii și moarte. El a etalonat metoda sa topografică cu tetrazoliu prin analiza germinației în condiții optime, deoarece în asemenea condiții potența germinativă este egală prin definiție, cu facultatea germinativă (Lindenbein, 1965).

În 1941 *Kuhn și Jerchel* au demonstrat valoarea sărurilor de tetrazoliu ca excelenți indicatori de reducere a materialelor biologice. Ei au scos în evidență superioritatea acestor substanțe față de dinitrobenzol, care produce o culoare efemeră și este toxic, precum și față de selenitul de sodiu, care, deși produce o colorare permanentă, este otrăvitor. De asemenea sărurile de tetrazoliu sînt mai stabile față de mulți coloranți și se pot folosi în condiții aerobe. *Nodvornik* a arătat, chiar înainte de 1946, că testul colorării cu tetrazoliu se poate folosi la determinarea viabilității semințelor forestiere, rezultatele fiind asemănătoare cu cele obținute la testele de germinație. *Flemmion și Poole* (1948) au făcut comparație între semințele dorminde și nedorminde de diferite viabilități, de specii lemnoase analizate cu metoda embrionului extras și cu tetrazoliu (L. Barton, 1961).

În ceea ce privește mecanismul de acțiune al sărurilor de tetrazoliu, diferite cercetări au arătat că ele sînt indicatori de reducere, punînd în evidență prezența procesului respirator activ. Procesele de reducere din țesuturile vii sînt influențate de enzime din grupa dehidrogenazelor, care activează, acceptă și transferă oxigenul. Au putut fi izolați trei factori: o proteină, o nucleotidă și o flavoproteină. Clorura (sau bromura) de tetrazoliu, folosită pentru determinarea viabilității semințelor sub formă de soluție apoasă incoloră, pătrunde în țesuturi prin difuzie și intră în procesul de reducere a celulelor vii acceptînd hidrogenul de la piridină. Hidrogenarea clorurei de tetrazoliu pro-

duce o substanță roșie, insolubilă, formazana. Meristemele, vasele, epidermele, rănilor, se colorează extrem de repede, pe cînd celulele parenchimului embrionului și endospermului își schimbă culoarea mult mai încet.

Deoarece, capacitatea de germinație a semințelor nu depinde de calitatea formazanei formate prin reducere, ci numai de localizarea și întinderea zonelor colorate, intensitatea colorării este fără importanță pentru aprecierea viabilității semințelor.

Un blocaj exclusiv fiziologic (de exemplu, starea dormindă) nu poate fi pusă în evidență prin testul cu tetrazoliu, întrucît dehidrogenazele există în cantități importante și în asemenea semințe. La această categorie de semințe, testul cu tetrazoliu este foarte util permițînd evaluarea calității semințelor aflate în stare de repaus.

Metoda analizei cu tetrazoliu este pusă la punct și s-a verificat timp de 20 de ani, pentru o mare parte din semințele forestiere supuse controlului. La foioase, s-au clasificat specii la care este necesară, atît aprecierea embrionului, cît și a endospermului. La rășinoase, cel mai adesea, starea de sănătate a endospermului are, de asemenea, mare importanță la stabilirea vitalității semințelor.

Lucrînd cu semințe forestiere, *W. Lindenbeim* și *H. Bulat* — (1960) au ajuns la concluzia că, folosirea metodei cu tetrazoliu este importantă, mai ales pentru speciile la care pentru determinarea potenței germinative se aplică metoda secționării, ca și pentru semințele cu o perioadă de germinație lungă. Testul cu tetrazoliu dă procentul de semințe germinabile plus procentul semințelor dorminde, capabile să se dezvolte ulterior.

În literatura de specialitate se găsesc destul de numeroase studii legate de metoda colorării cu tetrazoliu pentru diferite specii de plante, pentru care se dau clasificări, metode de pregătire și de tratare a semințelor, influența temperaturii la care se face tratamentul, durata tratamentului etc. (*Marin A.* 1948, *Evrard, R.* 1955, *H. Wharton* 1955, *Hilf, R.* și *Rohmeder, R.* 1956, *Verhey* 1957, *Buszewicz, G.* și *Holmes, G. D.* 1957, *Linnik, E. F.* 1959, *Germ, H.* 1960, *Cabral, J. T.* și *Cruz, M. R.* 1960, *Lindenbeim, W.* și *Bulat, H.* 1960 și 1961, *Kietreiber, M.* 1960 *Schubert, J.* 1961 și 1965, *Moore, R. P.* 1962 și 1963, *Bulat, H.* 1962 și 1963, *Lorato, A.* și *Amaducci, M. T.* 1964, *Lindenbeim, W.* 1965, *Atay, I.* 1966).

În cadrul analizelor de semințe, pe plan internațional, metoda testării cu tetrazoliu a fost admisă de către Asociația internațională de analiza semințelor (I.S.T.A) începînd cu 1953 (1956) pentru cîteva specii forestiere, indicațiile de efectuare a analizelor fiind însă destul de generale. Pe măsură ce cercetările au adus date noi, metoda capătă tot mai multă importanță, astfel încît în normele internaționale I.S.T.A. actualmente în vigoare (intrate în vigoare la 1 iulie 1966) folosirea testului cu tetrazoliu este admisă, în principiu, pentru toate speciile forestiere pentru care durata testului de germinație este egală sau depășește 60 de zile. Normele precizează tehnica de lucru precum și criteriile de clasificare a semințelor în viabile și neviabile pentru următoarele specii: *Acer spp.*, *Carpinus spp.*, *Fagus spp.*, *Fraxinus spp.*, *Juniperus spp.*, *Libocedrus spp.*, *Liriodendron spp.*, *Malus spp.*, *Pinus cembra*, *Pinus coulterii*, *Pinus heldreichii*, *Pinus jeffreyi*, *Pinus lambertiana*, *Pinus monticola*, *Pinus parvifolia*, *Pinus peuce*, *Pi-*

nus strobilus, Prunus spp., Pyrus spp., Rosa spp., Sorbus spp., Taxodium distichum, Taxus spp., Tilia spp. Pentru toate speciile este obligatorie folosirea unei soluții apoase de 1%, cu pH 6,5—7, de clorură sau bromură de tetrazoliu, iar pe timpul duratei tratamentului semințele trebuie ținute la întuneric, la temperatura de 30°C. Clasificarea semințelor în viabile și neviabile se bazează pe localizarea și întinderea necrozelor în embrion și endosperm, deci pe repartitia topografică a porțiunilor colorate și necolorate, iar nu pe intensitatea colorării.

La noi în țară, folosirea sărurilor de tetrazoliu la analiza calității semințelor a fost destul de sporadică. Dintre speciile forestiere sînt publicate rezultate numai pentru brad (*Constantin, A., Varga, D. 1953*).

În 1965, cu prilejul discutării proiectului de revizuire a STAS 1908-60, „Semințe de arbori și arbuști forestieri. Metode de analiză”, s-a ridicat problema introducerii metodelor celor mai noi pe plan mondial și în special punerea de acord a prevederilor standardului românesc cu prescripțiile normelor internaționale I.S.T.A. Printre altele s-a propus și includerea testului cu tetrazoliu ca metodă biochimică pentru determinarea potenței germinative a semințelor. Această propunere nu se putea adopta pe loc, pe de o parte, pentru că laboratoarele nu posedau suficientă experiență în folosirea acestei metode, iar pe de altă parte, pentru că indicii calitativi din STAS 1808-62 erau calculați pe baza altor metode (cu indigo carmin sau prin secționare). Se impunea deci experimentarea prealabilă a testului cu tetrazoliu, atât pentru deprinderea tehnicii de lucru (sau, la unele specii, chiar stabilirea unei tehnici de lucru) cît și pentru strîngerea de date care să permită calcularea unor noi indici calitativi.

B LUCRĂRI EFECTUATE

S-au luat în studiu speciile pentru care normele internaționale I.S.T.A. prevăd analiza cu tetrazoliu și pentru care STAS 1908-65 indică drept metodă de analiză secționarea sau colorarea cu indigo carmin. De asemenea s-au făcut experimentări și pentru specii care nu sînt luate în considerare în normele I.S.T.A., dar aparțin categoriilor menționate mai sus în STAS 1908-65. Bradul ocupă un loc aparte, în normele I.S.T.A. metoda de analiză fiind prin germinație, pe cînd în STAS 1908-65 este admisă și colorarea cu indigo carmin.

S-a lucrat cu următoarele specii: *Abies alba*, *Acer campestre*, *Acer platanoides*, *Acer pseudoplatanus*, *Acer tataricum*, *Carpinus betulus*, *Cornus mas*, *Cornus sanguinea*, *Corylus avellana*, *Crataegus monogyna*, *Euonymus europaea*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Ligustrum vulgare*, *Malus silvestris*, *Pirus pyraster*, *Prunus avium*, *Rosa canina*, *Tilia sp.*

În principiu, s-au făcut analize paralele, prin metoda prevăzută în STAS 1908-65 (colorare cu indigo-carmin sau secționare) și prin colorarea cu tetrazoliu la cîte cel puțin 30 probe de semințe pentru fiecare specie.

În primul an de cercetare (1966) s-au făcut tatonări atât în ceea ce privește tehnica de lucru, cît și timpul de înmuiere în apă și de tratare cu tetrazoliu. S-a evidențiat de la început necesitatea diferențierii timpilor de înmuiere și de tratare pentru semințele proaspete, față de cele vechi (cu o

vechime mai mare de 3—5 luni) care au o umiditate mai scăzută (sînt mai uscate). Tot odată s-au dovedit ca utile unele modificări în tehnica de lucru față de prescripțiile I.S.T.A., rezultînd o simplificare a operațiilor și sporirea preciziei analizei la unele specii.

Începînd cu toamna 1966 s-au aplicat tehnici de lucru diferențiate pe semințe proaspete și semințe vechi.

În conformitate cu prescripțiile normelor internaționale I.S.T.A., pentru analiza cu tetrazoliu s-a folosit o soluție apoasă, în concentrație de 1%, de clorură de tetrazoliu (triphenyltetrazoliumchlorid). Apa distilată folosită la prepararea soluției a avut un pH cuprins între 6,5 și 7. S-au folosit 4 repetiții a cîte 100 semințe, urmărind ca soluția de tetrazoliu să le acopere complet. În cursul tratamentului probele de semințe s-au păstrat la întuneric la temperatura de 30°C (în termostat). După terminarea tratării, soluția s-a scurs, semințele s-au spălat cu apă și apoi s-au examinat în vederea clasificării. Toleranțele pentru fiecare analiză au fost cele din STAS 1908-65, care corespundeau și cu cele din normele I.S.T.A. în vigoare în momentul întocmirii metodicii (actualele norme I.S.T.A. au toleranțe mai puțin pretențioase pentru valorile germinației mai mici de 95% și ceva mai strînse pentru valorile mai mari de 95%).

Clasificarea semințelor în viabile și neviabile s-a făcut astfel:

— La semințele cu endosperm s-au considerat viabile următoarele categorii:

— embrioni colorați în roșu în întregime, într-un endosperm de asemenea colorat în roșu;

— embrion complet colorat într-un endosperm cu pete incolore în partea periferică.

— La semințele la care substanțele de rezervă sînt depozitate în cotiledoane, (fără endosperm) s-au considerat viabile următoarele categorii:

— embrion complet colorat în roșu;

— embrion cu o pată incoloră la vîrfurile rădăcinii;

— embrion cu pete incolore pe cotiledoane, pînă la 1/2 din cotiledoane în partea opusă rădăcinii, în cazul necrozelor superficiale și pînă la 1/3 din suprafață, în cazul necrozelor profunde;

— ultimele două cazuri reunite.

La unele specii clasificarea are și alte particularități suplimentare, care vor fi menționate în mod expres mai jos.

Tehnica de lucru stabilită, funcție de prescripțiile I.S.T.A., de asimilările pentru speciile neprevăzute în normele I. S. T. A., precum și după rezultatele obținute din numeroase tatonări și analize prealabile a fost următoarea, pe specii:

Abies alba Mill. — Brad

Atît semințele proaspete, cît și cele vechi s-au ținut la mușchi 48 de ore, apoi s-a secționat lateral, longitudinal, o porțiune din tegument, în așa fel încît să se vadă endospermul, dar să nu se atingă embrionul; semințele astfel pregătite s-au ținut în soluția de tetrazoliu 24 ore cele proaspete și 48 ore cele vechi.

Pentru clasificare, semințele s-au desfăcut în două jumătăți, în lung, în așa fel încît să se poată examina cu ușurință, atît embrionul cît și endospermul.

Acer pseudoplatanus L. — Paltin de munte și *Acer platanoides L.* — Paltin de cîmp.

S-au scos semințele din pericarpul fructului și s-au pus la muiat timp de 24 ore cele proaspete și 48 de ore cele vechi. S-a îndepărtat apoi tegumentul seminței și s-a tăiat o porțiune de 0,5 mm la vîrfurile rădăcinii și pe cotiledoane în partea opusă rădăcinii. Tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore la semințele proaspete și 48 ore la cele vechi. Clasificarea ca la speciile fără endosperm cu mențiunea că petele incolore de pe rădăcină nu trebuie să depășească 1/2 din lungimea ei.

Acer campestre L. — Jugastru

S-a tăiat o porțiune de 1—2 mm pe trei laturi ale achenei exceptînd latura de contact a celor două fructe, apoi s-a pus la muiat, 24 ore semințele proaspete și 48 ore cele vechi. Tratarea cu tetrazoliu a durat 48 ore pentru ambele categorii de semințe. Clasificarea se face ca la paltini.

Acer tataricum L. Arțar tătăresc

S-au scos semințele din pericarpul fructului și s-au pus la muiat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi); s-a despicat apoi lateral semințele, fără a le desface și s-au pus la colorat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi). În vederea clasificării, semințele s-au desfăcut în două jumătăți, iar categorisirea semințelor în viabile și neviabile, s-a făcut ca la paltini.

Carpinus betulus L. — Carpin

S-a tăiat 1/3 din fruct, în partea rotunjită, opusă rădăcinii; atît înmuierea în apă cît și tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore la semințele proaspete și 48 ore la cele vechi. După tratare, embrioanele s-au extras din fruct și s-au clasificat (vezi clasificarea semințelor fără endosperm).

Cornus mas L. — Corn și *Cornus sanguinea L.* — Sînger

S-a secționat 1/3 din fruct sau mai mult în partea rotunjită, opusă rădăcinii, apoi fructele s-au pus la muiat 48 ore (cele proaspete) sau 60 ore (cele vechi). La corn tratarea cu tetrazoliu a durat 48 ore pentru ambele categorii de semințe, iar la sînger 24 ore pentru cele proaspete și 48 ore pentru cele vechi. După tratare, semințele s-au extras din fruct (cel puțin una) cu ajutorul unui ac.

S-au clasificat drept viabil embrionii colorați în roșu, ca aspect general.

Corylus avellana L. — Alun

S-au scos semințele din pericarpul fructului și s-au pus la muiat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi); s-a scos apoi tegumentul brun al seminței și s-a tăiat fiecare sămînță în două, în lungul liniei de separare a celor două cotiledoane. S-au pus la colorat numai cotiledoanele care au rădăcina și plumula; tratamentul cu tetrazoliu a durat 24 ore pentru semințele proaspete și 30 ore pentru cele vechi. Clasificarea ca la semințele fără endosperm cu mențiunea că se

admit pete necolorate pe cotiledoane pînă la 1/2 din suprafață în partea opusă radiclei sau în centrul părții ventrale a cotiledoanelor, dacă diametrul petei nu este mai mare decît raza cotiledonului.

Crataegus monogyna Jacq. — Păducel și *Rosa canina* L. — Măceș.

S-a secționat 1/3 din sămînță sau ceva mai mult, în partea rotunjită, opusă radiclei. Atît înmuierea în apă cît și tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore pentru semințele proaspete și 48 ore pentru cele vechi. După tratare semințele s-au scos din fruct și s-au clasificat după cum s-a menționat la categoria semințelor fără endosperm.

Euonymus europaea L. — Salbă moale

S-au muiat semințele în apă 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi), apoi s-a secționat, în lungul seminței, pe ambele laturi o porțiune de 0,5 mm, fără a vătăma embrionul. Tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore la semințele proaspete și 30 de ore la cele vechi; clasificarea ca la semințele cu endosperm.

Fagus sylvatica L. — Fag.

S-a scos pericarpul fructului, iar semințele s-au pus la muiat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi); s-a îndepărtat apoi tegumentul brun al seminței. Tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore la semințele proaspete și 30 ore la cele vechi. S-au considerat viabile semințele cu embrionul complet colorat, cele cu o pată incoloră la vîrfurile radiclei dar nu mai mult de 1/3 din partea vizibilă a ei și cele cu pete incolore pe partea superioară a cotiledoanelor, în porțiunea opusă radiclei.

Fraxinus sp. — (Frasin comun și mojdrean)

S-a scos pericarpul fructului, iar semințele s-au pus la muiat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi); s-a tăiat apoi, pe ambele laturi o porțiune de 1 mm pînă la ambele extremități ale seminței. Tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi). S-au desfăcut apoi semințele în două jumătăți și s-au clasificat cum s-a arătat la semințele cu endosperm.

Ligustrum vulgare L. — Lemn cînesc

S-au muiat semințele în apă 24 ore (cele proaspete) sau 48 ore (cele vechi), apoi s-a tăiat pe o latură o porțiune de 1 mm și s-au pus semințele în soluție de tetrazoliu 24 ore cele proaspete și 30 de ore cele vechi. S-au considerat viabile semințele cu embrion complet colorat într-un endosperm cu pete incolore, mici și superficiale, la periferia lui.

Malus silvestris Mill — Măr și *Pirus pyraster* L. Medik — Păr

S-au muiat semințele în apă 24 ore (cele proaspete) și 48 ore (cele vechi), apoi s-au îndepărtat, tegumentul tare și învelișul intern al seminței care conține endospermul. Tratarea cu tetrazoliu a durat 24 ore pentru semințele proaspete și 30 de ore pentru cele vechi. Clasificarea ca la semințele fără endosperm.

Prunus sp. — (Cireș, vișin turcesc, corcoduș, porumbar). S-au spart sîmburii, s-au scos semințele și s-au pus la muiat 24 ore

(cele proaspete) și 48 ore (cele vechi). Este util a se zgîria tegumentul semințelor pe cotiledoane, în partea rotunjită, opusă radiclei, înainte de muiere. S-a îndepărtat apoi tegumentul brun și endospermul, iar embrioanele s-au tratat cu soluție de tetrazoliu 24 ore la semințele proaspete și 30 de ore la cele vechi. Clasificarea ca la semințele fără endosperm.

Tilia sp. (Tei argintiu, tei pufoș și tei cu frunza mare).

S-a scos pericarpul fructului, s-a zgîriat tegumentul brun al semințelor și s-au pus la muiat 24 ore semințele proaspete sau 48 ore semințele vechi. După muiere, s-a îndepărtat tegumentul brun, iar endospermul, care conține embrionul, s-a pus în soluție de tetrazoliu 24 ore pentru semințele proaspete și 30 de ore pentru cele vechi. Clasificarea este aceeași ca la semințele cu endosperm.

C REZULTATE OBȚINUTE

a REZULTATE COMPARATIVE PRIVIND POTENȚA GERMINATIVĂ DETERMINATĂ PRIN METODELE STAS ȘI PRIN COLORAREA CU TETRAZOLIU

Pentru fiecare specie analizată s-au comparat rezultatele obținute prin metoda STAS și prin metoda cu tetrazoliu separat pentru semințe proaspete și separat pentru semințe vechi, folosind testul t , pentru speciile la care se efectuaseră 30 analize și cu ajutorul toleranțelor I.S.T.A. admise între două metode diferite aplicate aceleiași probe, pentru speciile la care s-au făcut un număr mai mic de analize.

Rezultatele comparative obținute, pe specii, sînt următoarele:

Abies alba Mill.

Experimentările s-au făcut în paralel prin metoda colorării cu indigo carmin, actualmente în uz și admisă de STAS 1908-65 și prin metoda colorării cu tetrazoliu ca o metodă rapidă și sigură, posibil de introdus în standard.

În timpul analizelor s-a remarcat ușurința clasificării embrionilor viabili de cei neviabili prin repartiția topografică a părților colorate în roșu față de cele necolorate. Se elimină în special incertitudinea, care apare adesea la colorarea cu indigo carmin la clasificare în categoria a II-a sau a III-a a embrionilor cu un punct slab colorat în albastru la vîrfurile radiclei (categoria a II-a embrioni viabili) sau cu vîrfurile radiclei puternic colorat (categoria a III-a, embrioni neviabili). Obligativitatea unei colorări integrale a embrionilor viabili în roșu, la metoda cu tetrazoliu, elimină erorile ce apăreau uneori din cauzele menționate mai sus. Pe de altă parte, luarea în considerare a stării de sănătate a endospermului mărește siguranța rezultatelor la analiza cu tetrazoliu, comparativ cu analiza cu indigo carmin.

Analizînd rezultatele cifrice obținute (tabelul 1) se observă totuși că, atît la semințele proaspete, cît și la cele vechi, mediile aritmetice nu diferă prea mult între ele, lucru ce a reieșit și la aplicarea testului t care arată lipsa de diferențe statistic semnificative între cele două metode ($t = 0,5$, $P = 68,8$ pentru semințele proaspete și $t = 1,6$, $P = 11,4$ pentru semințele vechi).

Acer platanoides L.

Conform STAS 1908-65 potența germinativă pentru semințele de paltin de câmp se determină prin secționare, iar normele I.S.T.A. admit pe lângă metoda fiziologică cu pretratament și metoda cu tetrazoliu.

La analizele cu tetrazoliu, aplicarea tehnicii de lucru menționate permite o distingere clară între semințele viabile și neviabile. La semințele vechi muierea insuficientă în apă (24 ore) duce la clasificări nesigure. S-au obținut diferențe semnificative între metode atât la semințele proaspete, cât și la cele vechi (tabelul 1). Pentru semințele proaspete, $t = 2,5$, iar $P = 1,2$; pentru semințele vechi (14 probe) diferența între mediile aritmetice a fost de 18,97, ceea ce depășește cu mult toleranța de 7 admisă de normele I.S.T.A.

Se remarcă o variabilitate mai mare a potenței germinative în cazul aplicării metodei cu tetrazoliu, atât pentru semințele proaspete, cât mai ales pentru cele vechi, ceea ce pune în evidență faptul că, colorarea cu tetrazoliu permite decelarea embrionilor morți, care la analiza vizuală în timpul secționării nu pot fi deosebiți de cei vii. Aceeași concluzie se poate trage și din analiza preciziei rezultatelor, calculată la metodele paralele aplicate.

La semințele proaspete, o valoare scăzută a potenței germinative se poate explica și printr-o recoltare prea timpurie a semințelor, înainte de o maturare deplină. Păstrate pînă primăvara (6—7 luni) asemenea semințe și-au pierdut vitalitatea.

Acer pseudoplatanus L.

Semințele de paltin de munte s-au analizat în paralel prin secționare și cu tetrazoliu.

La semințele vechi, la timpul de muiere și tratare precizat la punctul 2, embrionii morți rămîn total verzi, pe cînd la semințele care nu și-au pierdut viabilitatea culoarea se modifică în verde-roșcat, adesea cu pete roșii-brune. La semințele proaspete colorarea în roșu a embrionilor vii este mult mai clară.

Diferențele între metode sînt foarte mari la semințele vechi, unde practic este imposibil să fie descoperite prin secționarea semințelor moarte, deoarece ele nu și-au modificat culoarea (tabelul 1). Aplicînd testul t a rezultat $t = 3,9$, $P < 0,1$ deci o diferență foarte semnificativă pentru semințele proaspete. Pentru semințele vechi diferențele sînt de asemenea foarte semnificative între cele două metode ($t = 10,7$, $P < 0,1$).

Potența germinativă a semințelor proaspete variază între limite relativ apropiate (de la 45 % la 95 %) în cazul aplicării metodei secționării și în limite foarte largi (de la 5 % la 95 %) la testul cu tetrazoliu. La semințele vechi acest aspect este și mai bine pus în evidență prin frecvența mare a valorilor scăzute ale potenței germinative. Acestea scot în evidență subiectivitatea accentuată a metodei secționării prin care nu se pot identifica decît semințele stricate evident, modificate la culoare, dar nu și cele care și-au pierdut vitalitatea, deși la o examinare vizuală culoarea și consistența embrionului par normale.

Acer campestre L.

La jogastru, determinarea potenței germinative prin secționare (metoda STAS) și cu tetrazoliu a dus la rezultate diferite (tabelul 1) care scot în evidență precizia mai mică a metodei secționării. Clasificarea embrionilor

Rezultate comparative la determinarea potenței germinative

Metoda de analiză	Nr. de probe analizate	Semințe proaspete				Nr. de probe analizate	Semințe vechi					
		Media aritm. \bar{x}	Abateră standard s	Eroarea mediei s \bar{x}	Coef. de variație S%		Precizia P%	Media aritm. \bar{x}	Abateră standard s	Eroarea mediei s \bar{x}	Coef. de variație S%	Precizia P%
I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. <i>Abies alba</i> Mill												
Indigo carmin	42	37,38	18,10	2,80	48,42	7,5	27	27,96	12,42	2,39	44,42	8,5
Tetrazoliu	42	35,71	19,81	3,06	55,47	8,6	27	33,51	12,82	2,47	36,46	7,4
2. <i>Acer platanoides</i> L.												
Secționare	30	78,00	13,70	2,50	17,60	3,2	14	82,86	10,10	2,70	12,00	3,2
Tetrazoliu	30	66,42	20,12	3,81	30,29	5,7	14	63,89	29,98	9,99	46,92	15,6
3. <i>Acer pseudoplatanus</i> L.												
Secționare	84	77,86	9,90	1,10	12,71	1,4	130	77,00	8,60	0,75	11,10	0,9
Tetrazoliu	84	70,20	15,0	1,63	21,40	2,3	130	57,00	12,20	1,70	21,00	3,0
4. <i>Acer campestre</i>												
Secționare	22	60,00	17,50	3,73	29,00	6,0	15	56,33	16,30	4,21	29,00	7,4
Tetrazoliu	22	46,36	18,10	3,85	39,00	8,0	15	27,00	28,80	5,90	84,00	21,0
5. <i>Acer tataricum</i> L.												
Secționare	8	92,46	(medii simple)				25	89,80	4,79	0,95	5,33	1,0
Tetrazoliu	8	85,72	(medii simple)				25	56,60	32,80	6,56	57,95	11,6

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>6. Carpinus betulus L.</i>												
Secționare	18	77,77	13,25	3,12	17,03	4,0	13	78,07	10,65	2,95	13,64	3,7
Tetrazoliu	18	70,65	16,89	3,52	23,90	4,9	13	67,72	20,04	6,05	29,59	8,9
<i>7. Cornus mas. L.</i>												
Secționare	17	97,88	2,42	0,58	2,47	0,6						
Tetrazoliu	17	79,11	26,35	6,39	33,30	8,1						
<i>8. Cornus sanguinea L.</i>												
Secționare	30	98,86	2,16	0,39	2,18	0,4	25	96,40	7,86	1,57	8,15	1,9
Tetrazoliu	30	85,33	17,98	3,28	21,07	3,8	25	62,20	25,69	5,14	41,30	8,3
<i>9. Corylus avellana L.</i>												
Indigo carmin	15	75,90	9,00	2,72	11,85	3,6						
Tetrazoliu	15	73,00	17,20	4,44	23,56	6,1						
<i>10. Crataegus monogyna Jacq</i>												
Secționare	36	74,73	13,63	2,27	18,23	3,0	14	80,00	9,05	2,42	11,31	3,0
Tetrazoliu	36	56,94	21,44	3,57	37,65	6,2	14	65,71	20,82	5,56	31,68	8,4
<i>11. Euonymus europaea L.</i>												
Secționare	28	97,28	2,82	0,55	2,89	0,5	13	96,00	2,94	0,81	3,06	0,8
Tetrazoliu	28	86,65	11,52	2,17	13,42	2,5	13	77,31	31,63	8,78	40,86	11,3
<i>12. Fagus sylvatica L.</i>												
Indigo carmin	27	75,00	9,74	1,87	12,98	2,5						
Tetrazoliu	27	73,89	11,13	2,14	15,06	2,8						

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<i>13. Fraxinus excelsior L.</i>												
Indigo carmin	32	66,88	20,22	3,58	30,23	5,3	36	63,89	22,58	3,76	35,34	5,8
Tetrazoliu	32	62,19	19,72	3,49	31,71	5,6	36	57,78	23,29	3,88	40,31	6,7
<i>14. Malus silvestris Mill</i>												
Indigo carmin	20	85,50	12,00	2,68	13,00	3,1	19	81,31	25,90	5,96	32,0	7,3
Tetrazoliu	20	85,50	12,40	2,80	14,50	3,3	19	81,31	24,30	5,57	30,0	6,8
<i>15. Ligustrum vulgare L.</i>												
Indigo carmin	20	75,50	23,39	5,23	30,98	6,9	10	75,00	28,98	9,17	38,64	12,2
Tetrazoliu	20	78,50	23,72	5,31	30,22	6,8	10	74,00	29,82	9,43	40,29	12,7
<i>16. Pirus pyrastiv Medik</i>												
Indigo carmin	21	80,74	16,49	3,62	20,43	4,5	9	70,55	23,14	7,71	32,79	10,9
Tetrazoliu	21	77,85	15,57	3,42	20,00	4,4	9	65,00	22,19	7,39	34,13	11,4
<i>17. Pirus avium L.</i>												
Indigo carmin	99	69,85	20,17	2,03	28,86	2,9	38	60,79	19,28	3,13	31,72	5,1
Tetrazoliu	99	68,43	23,10	2,32	33,76	3,4	38	64,74	20,19	3,27	31,19	5,0
<i>18. Rosa canina L.</i>												
Secționare	24	87,50	8,28	1,69	9,46	1,9	14	86,42	6,31	1,68	7,30	1,9
Tetrazoliu	24	69,16	25,96	5,30	37,53	7,6	14	70,00	18,42	4,92	26,31	7,0
<i>19. Tilia tomentosa Moench</i>												
Secționare	37	75,54	16,09	2,64	21,29	3,5	17	72,65	20,44	4,96	28,13	6,8
Tetrazoliu	37	67,16	17,41	2,86	25,92	4,2	17	63,24	25,26	6,13	39,94	9,7

viabili și a celor neviabili este ușoară, colorarea fiind clară chiar la semințele vechi.

Diferențele apreciate după toleranțele I.S.T.A. sînt autentice atît la semințele vechi cît și la cele proaspete (tabelul 2).

Tabelul 2

Metoda de analiză	Media simplă pentru potența germinativă		Diferențe între metode	
	Semințe proaspete %	Semințe vechi %	Toleranța I.S.T.A.	
			Semințe proaspete	Semințe vechi
Secționare	60,00	56,33		
Tetrazoliu	46,36	27,00	$\frac{13,64}{8}$	$\frac{29,33}{8}$

Acer tataricum L.

Și pentru arțarul tătăresc, metoda secționării, dă pentru potența germinativă, valori mult mai mari față de colorarea cu tetrazoliu. Colorarea cu tetrazoliu, folosind tehnica de lucru menționată, este foarte clară și clasificarea ușoară, atît la semințele proaspete, cît și la cele vechi.

După cum rezultă din tabelul 1 numărul de 25 probe la semințele vechi a fost suficient la metoda secționării (precizia 1%), dar insuficient în condițiile preciziei mai mici de 5% la aplicarea testului cu tetrazoliu. Clasele mici ale potenței germinative (5—25%) au fost frecvente la analiza cu tetrazoliu, pe cînd la secționare s-au obținut valori de peste 80%, ceea ce explică cele afirmate anterior.

La semințele proaspete media simplă a potenței germinative a fost 92,48% la analiza prin secționare și 85,72% la metoda cu tetrazoliu, diferența de 6,68% mai mare decît toleranța I.S.T.A. de 5, atestînd rezultatele diferite ce se obțin la cele două metode.

Carpinus betulus L.

Valorile obținute la analiza cu tetrazoliu au fost totdeauna mai mici decît cele obținute prin secționare (tabelul 1) diferențele fiind însă mai mari la semințele vechi. Ca și la acerinee și pentru carpin putem afirma că secționarea nu poate pune în evidență pierderea vitalității semințelor a căror culoare nu diferă de cea normală.

Cornus mas L.

Analizele comparative s-au făcut prin secționare și cu tetrazoliu (tabelul 1). Se remarcă o variabilitate mult mai mare a potenței germinative, a semințelor proaspete, la analiză cu tetrazoliu (de la 15% la 95%) față de secționare (de la 90% la 100%). Variația mică a potenței germinative determinate prin secționare scoate în evidență imposibilitatea acestei metode de a permite o clasificare corectă a embrionilor.

Diferența între potențele germinative determinate prin cele două metode este de 18,77 față de toleranța 5 admisă de {normele I.S.T.A. pentru două metode paralele aplicate aceleiași probe. Aceasta înseamnă că, cele două metode dau, efectiv, rezultate diferite.

Cornus sanguinea L.

Precizia analizei cu tetrazoliu este evident mai mare decât cea obținută prin secționare, la care nu se pot distinge la analiza vizuală embrionii morți, care nu și-au alterat aproape deloc culoarea normală. Trebuie menționat însă că, la analiza cu tetrazoliu se pot distinge cu ușurință numai două categorii: embrion colorați și embrioni total necolorați. În condiții practice de lucru, embrionii parțial colorați nu se pot deosebi și de fapt trec la embrioni viabili, chiar dacă, eventual radicali ar fi moartă. Acest aspect este valabil și la corn.

Datele din tabelul 1 arată deosebiri evidente între rezultatele ce se obțin prin cele două metode. Testul t , confirmă existența unor diferențe distinct semnificative la semințele proaspete ($t = 2,9$ și $P = 0,57$) și foarte semnificative la semințele vechi ($t = 5,9$ și $P < 0,1$).

La semințele proaspete, potența germinativă determinată prin secționare are valori foarte mari (de la 90% la 100%) pe când la determinările cu tetrazoliu s-au obținut valori de la 15% la 95%. La semințele vechi, la metoda cu tetrazoliu potența germinativă variază de la 5% la 95%.

Corylus avellana L.

Metodele paralele experimentate au fost colorarea cu indigo carmin și colorarea cu tetrazoliu. După cum rezultă din tabelul 1 deși coeficientul de variație la testul cu tetrazoliu este mai mare decât la analiza cu indigo carmin, valorile medii pentru potența germinativă nu diferă prea mult între ele. Diferența între aceste valori de 2,90 fiind mai mică decât toleranța I.S.T.A. de 7, rezultă că cele două metode dau rezultate asemănătoare la semințele proaspete.

Crataegus mongyna Jacq.

Ca și la celelalte specii la care STAS 1908-65 prevede determinarea potenței germinative prin secționare și pentru păducel, diferențele față de rezultatele analizei cu tetrazoliu sînt mari (tabelul 1). Aplicînd testul t la semințele proaspete a rezultat $t = 4,1$ și $P \leq 0,1$, deci diferențele sînt foarte semnificative. La semințele vechi, diferența între cele două valori ale potenței germinative este de 14,29 deci mai mare decât toleranța I.S.T.A. de 7, ceea ce înseamnă că și aceste diferențe sînt semnificative. Se remarcă o variație mai largă a potenței germinative în jurul mediei și o frecvență relativ mare a claselor de 35% și 45% pentru potența germinativă determinată prin colorare cu tetrazoliu, comparativ cu secționarea.

Euonymus europaea L.

Din tabelul 1 rezultă că prin testul cu tetrazoliu se obțin valori mai mici ale potenței germinative, atît la semințele proaspete, cît și la semințele vechi, comparativ cu metoda secționării. Pentru semințele proaspete diferențele sînt foarte semnificative ($t = 5,2$ și $P < 0,1$). La semințele vechi diferența între cele două potențe germinative a fost de 8,69 mai mare decât 5 (toleranța

I.S.T.A.), deci diferența este autentică. La analiza prin secționare valorile potenței germinative se grupează de la 94% la 100%, pe cînd la analiza cu tetrazoliu frecvențele potenței germinative ale aceluiași loturi de semințe sînt distribuite mai larg începînd cu valori de 60%. Aceasta scoate în evidență precizia nesatisfăcătoare a metodei secționării.

Fagus sylvatica L.

Din rezultatele obținute la analizele paralele (tabelul 1) se remarcă o asemănare între rezultatele obținute prin metoda colorării cu indigo carmin și cu tetrazoliu, cu toate că la analizele cu tetrazoliu, variația potenței germinative este ceva mai mare. La semințe proaspete testul t dovedește că nu sînt diferențe semnificative între cele două metode ($t = 0,4$). Menționăm că la tehnica de lucru, extragerea prealabilă a pericarpului fructului și înmuierea în apă 24 ore a dat rezultate bune, eliminîndu-se cea de a doua înmuiere prevăzută în normele I. S. T. A., unde se recomandă ca prima înmuiere să se facă cu pericarp cu tot.

Fraxinus excelsior L.

Colorarea cu indigo carmin, prevăzută în standardul actual, ia în considerare numai embrionul seminței, pe cînd metoda cu tetrazoliu se referă atît la embrion, cît și la endosperm, ceea ce permite o evaluare mai corectă, în cazul acestei din urmă metode. Rezultatele obținute prin cele două metode (tabelul 1) nu diferă prea mult între ele, dar la testul cu tetrazoliu se obțin întotdeauna valori mai mici, iar coeficientul de variație este mai mare. Diferențele se accentuează în cazul semințelor vechi. Totuși, aplicînd testul t , a rezultat la semințele proaspete $t = 0,9$ și $P = 33,8$ iar la semințele vechi, $t = 1,1$ și $P = 27,1$, ceea ce corespunde cu o lipsă de semnificație statistică a acestor diferențe. Analizînd distribuția frecvențelor potenței germinative remarcăm însă că la testul cu tetrazoliu, categoriile mai mici de 65% sînt mai bine reprezentate, ceea ce înseamnă că această metodă pune mai bine în evidență semințele neviabile în cadrul loturilor cu o vitalitate mai redusă.

Ligustrum vulgare L.

Deși la colorarea cu indigo carmin, se ia în considerare numai embrionul, iar la colorarea cu tetrazoliu se analizează și endospermul, rezultatele obținute prin cele două metode sînt apropiate (tabelul 1). La semințele proaspete, diferența de 3,0 între potențele germinative determinată prin cele două metode este mai mică decît toleranța 7, iar la semințele vechi diferența este 1,0 față de aceeași toleranță I.S.T.A. Diferențele nu sînt deci autentice.

Malus silvestris Mill.

Rezultatele obținute prin colorare cu indigo carmin și cu tetrazoliu sînt aceleași, neexistînd diferențe între mediile aritmetice respective (tabelul 1). Se remarcă că, la această specie la ambele metode colorarea se apreciază pe embrion, luat în totalitate.

Pirus pyraster L.; Medik

Din punct de vedere statistic diferențele între potențele germinative determinate prin colorare cu indigo carmin și cu tetrazoliu nu sînt autentice ($t = 0,5$ și $P = 68,9$) la semințele proaspete. La semințele vechi diferența

între medii este 5,55 adică mai mică decît toleranța I.S.T.A. corespunzătoare de 7, deci rezultatele sînt practic aceleași.

Prunus avium L.

După cum rezultă din tabelul 1 valorile medii obținute pentru potența germinativă prin colorare cu indigo carmin și cu tetrazoliu, sînt apropiate, atît la semințele proaspete ($t = 0,4$ și $P = 68,8$) cît și la cele vechi ($t = 0,9$ și $P = 33,8$). Putem afirma că cele două metode exprimă cu aceeași precizie capacitatea germinativă a semințelor.

Rosa canina L.

Analizele comparative s-au făcut prin secționare și cu tetrazoliu. Tehnica de lucrul analiza cu tetrazoliu este destul de migăloasă; extragerea embrionului după colorare se soldează uneori cu ruperea acestuia și deci cu imposibilitatea distingerii exacte a proporției în care apar petele necolorate și întinderea lor. Cel mai adesea însă embrionii ies singuri din învelișul tare în timpul tratamentului și la aceștia clasificarea este ușoară.

Potența germinativă determinată cu tetrazoliu a avut totdeauna valori mai mici (tabelul 1). Faptul că apar asemenea diferențe și la semințele proaspete atrage atenția asupra diminuării posibile a capacității germinative a semințelor din cauza unei prelucrări necorespunzătoare a fructelor (fapt remarcat și la alte specii cu fructe cărnose).

Pentru semințele proaspete diferența de 18,34 între valorile potenței germinative determinate prin cele două metode este mai mare decît toleranța I.S.T.A. (6), ceea ce atestă autenticitatea acestei diferențe. Pentru semințele vechi diferența de 16,42 este de asemenea mai mare decît toleranța I.S.T.A. (7) corespunzătoare.

Tilia tomentosa Moench.

În ceea ce privește analizele cu tetrazoliu se remarcă eficiența metodei adoptate și claritatea cu care se poate face clasificarea embrionilor, dar operațiile sînt foarte migăloase, iar timpul de lucru folosit este dublu față de alte specii analizate prin această metodă.

Potența germinativă determinată cu tetrazoliu este mai mică decît aceea determinată prin secționare (tabelul 1). La semințele proaspete diferențele sînt statistic semnificative ($t = 2,1$ și $P = 3,6$). La semințele vechi, diferența de 9,41 depășește toleranța 7 admisă de normele I.S.T.A., deci și la aceste semințe diferențele sînt autentice. De altfel, se remarcă și frecvențe mai mari pentru valorile mici ale potenței germinative în cazul analizei cu tetrazoliu.

În afară de aceste specii, propuse a fi luate în studiu în metodică s-au mai analizat și alte specii și anume: *Fraxinus ornus L.* (mojdrean), *Prunus cerasifera Ehrh.* (corcoduș), *Prunus mahaleb L.* (vișin turcesc), *Prunus spinosa L.* (porumbar), *Tilia cordata Mill.* (tei pucios), *Tilia platyphyllos Scop.* (tei cu frunza mare). Ca și la celelalte specii s-au făcut analize paralele cu metoda prevăzută în STAS 1908-65 și prin colorare cu tetrazoliu. La colorarea cu tetrazoliu tehnica de lucru adoptată a fost cea corespunzătoare speciei din același gen, care a fost studiată mai pe larg și despre care s-a vorbit mai sus.

Rezultatele obținute se încadrează în concluziile trase la speciile din același gen, în sensul că la speciile pentru care s-a aplicat în paralel secționarea, analizele cu tetrazoliu dau rezultate diferite (tei pucios și tei cu frunza mare). Analizele cu indigo carmin dau însă rezultate apropiate de cele obținute la testul cu tetrazoliu (mojdrean, corcoduș, vișin turcesc, porumbar).

b INDICI CALITATIVI PENTRU POTENȚA GERMINATIVĂ DETERMINATĂ PRIN TESTUL CU TETRAZOLIU

Schimbarea metodei de analiză implică și necesitatea schimbării indicilor calitativi pe care loturile de semințe trebuie să le realizeze pentru a putea fi folosite în cultură. Se înțelege că, fixarea unor indici de calitate, în afară de variația datorită speciei (inclusiv arealul ei de distribuție și variația recoltei de la an la an) și cea datorită metodei, depinde și de exigența noastră, cu alte cuvinte de intensitatea selecției aplicate.

În cazul fixării a trei clase de calitate, se consideră, în general, că media aritmetică X corespunde valorii minime pentru calitatea a II-a, iar limitele minime pentru calitatea I și a III-a se fixează în limitele abaterii standard ($X + s$ și $X - s$). Totuși aplicarea mecanică a acestor limite nu poate satisface întotdeauna. Într-adevăr trebuie să ne mai punem problema, în ce proporție se încadrează loturile de semințe în fiecare clasă de calitate, respectiv câte loturi vor fi eliminate din culturi, dacă nu satisfac nici limita fixată pentru calitatea a III-a.

Ținând seama de considerentele de mai sus, la fixarea indicilor calitativi pentru potența germinativă stabilită prin colorare cu tetrazoliu, am procedat astfel:

S-au luat în considerare numai speciile pentru care s-au efectuat cel puțin 30 de analize, socotind atât analizele efectuate pentru semințele proaspete, cât și cele efectuate pentru semințele vechi. Aceste date corespund variației anuale și repartiției generale ale speciei pe teritoriul țării, semințele provenind din 3 ani de recoltă (1965, 1966 și 1967) și din toate regiunile țării.

Cu datele de mai sus s-a calculat media aritmetică (X), abaterea standard (s), eroarea mediei (s_x), coeficientul de variație ($s\%$) și precizia ($p\%$). S-au luat apoi în considerare numai speciile pentru care precizia calculelor nu a fost mai mare de 6%, adică cu riscul de a greși în 6 cazuri dintr-o sută.

Precizăm, că a fost necesar să se excludă din calcule valorile foarte mici obținute pentru potența germinativă, mai ales la semințele vechi. E vorba aici de loturile care și-au pierdut vitalitatea și pentru care s-a obținut adesea potența zero sau valori mai mici de 10 procente. De remarcat că, asemenea situații s-au mai întâlnit și la semințele proaspete la specii cu fructe cărnoase (cireș, păducel, măr ș. a.) unde prelucrarea acestora a fost defectuoasă (de obicei macerare prelungită).

Limitele inferioare pentru cele trei clase de calitate s-au fixat inițial la $x - s$ pentru calitatea a III-a, X pentru calitatea a II-a și $X + s$ pentru calitatea I. Ne-am propus apoi ca intensitatea generală a selecției în masă ce se realizează cu prilejul standardizării, să nu elimine mai mult de 20 % din numărul total al loturilor analizate pentru o specie oarecare, cu alte cuvinte

Valoarea potenței germinative determinată prin metoda biochimică cu tetrazoliu

Nr crt	1	Nr. de probe analizate	Media aritmetică \bar{x}	Abaterea Standard s	Precizia p%	Indicii calitativi calculați $\frac{I \cdot \bar{x} + s}{C \cdot III \cdot \bar{x} - s}$			Indicii calitativi ce se propun	Procent de rea- litate a indicilor propuși	Indicii actuali din STAS 1808-62
						6	7	8			
0		2	3	4	5	6	7	8	9		
1	Abies alba Mill.	63	37,06	15,54	5,3	52,60 37,06 21,52	52	22,2 61,9 85,7	45 35 25		
2	Acer campestre L.	31	45,00	18,31	7,3	63,31 45,00 26,69	63 50 30	19,3 72,7 80,6	75 55 35		
3	Acer platanoides L.	37	63,10	22,40	5,8	85,50 63,10 40,70	85 60 40	21,6 62,1 86,4	90 75 60		
4	Acer pseudopla- tanus L	135	65,66	18,98	2,5	84,64 65,66 46,68	80 65 50	24,4 64,4 81,4	90 80 70		
5	Acer tataricum L.	27	76,85	17,00	4,2	93,85 76,85 59,85	90 76 60	25,8 59,2 85,1	90 80 70		
6	Carpinus betulus L.	34	68,52	17,64	4,4	86,16 68,52 50,88	80 64 50	26,4 64,1 85,2	90 75 60		
7	Cornus mas L.	19	80,26	22,23	6,3	102,49 80,26 58,03	98 80 58	22,2 73,6 84,2	95 90 85		
8	Cornus sanguinea L	52	77,69	22,02	3,9	99,71 77,69 55,67	96 75 55	21,1 65,3 86,5	95 90 85		
9	Corylus avellana L.	16	72,50	16,76	5,7	89,26 72,50 55,74	85 70 55	18,7 56,2 81,2	85 75 65		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq	49	62,55	19,37	4,4	81,92 62,55 43,18	80 60 40	20,4 57,1 83,6	90 70 55
11	<i>Euonymus europaea</i> L.	40	85,25	16,50	3,1	101,75 85,25 68,75	96 85 70	22,5 62,5 87,5	90 80 70
12	<i>Fagus sylvatica</i> L.	30	73,67	11,14	2,7	84,81 73,67 62,53	82 70 65	16,6 56,6 86,6	90 75 60
13	<i>Fraxinus excelsior</i> L.	66	61,50	19,10	3,8	80,62 61,52 42,42	80 60 40	18,1 60,6 80,3	85 70 55
14	<i>Ligustrum vulgare</i> L.	28	78,53	17,08	4,1	95,61 78,53 61,45	92 78 60	30,7 71,5 85,6	85 75 65
15	<i>Malus silvestris</i> Mill	39	82,69	18,46	3,5	101,15 82,69 64,23	96 83 64	30,7 66,6 89,7	90 80 70
16	<i>Pirus pyrastrer</i> Medik	30	74,00	21,34	5,3	95,34 74,00 53,66	95 70 54	26,6 60,0 83,3	90 75 60
17	<i>Prunus avium</i> L.	133	69,28	19,97	2,5	89,25 69,28 49,31	88 70 50	17,2 60,1 84,9	85 70 55
18	<i>Rosa canina</i> L.	36	73,05	18,38	4,2	91,43 73,05 54,67	86 70 55	19,4 56,3 86,1	90 80 70
19	<i>Tilia cordata</i> Mill.	54	82,96	6,60	1,1	89,46 82,96 76,32	90 80 75	18,5 64,8 90,7	90 70 50
20	<i>Tilia tomentosa</i> Moench	141	67,48	14,50	1,8	81,97 67,48 52,98	78 67 55	16,2 63,1 87,2	90 75 60

s-a pus condiția ca limita inferioară a calității a.III-a să se realizeze în cel puțin 80% din cazuri. Funcție de această condiție s-a modificat corespunzător limita inițial fixată din calcul. La fel s-a procedat și la definitivarea limitelor inferioare pentru calitatea a II-a și I punind condiția ca 60% din loturi să se încadreze corespunzător limitei calității a doua, iar dacă se ia ca limita minimă valoarea propusă la calitatea I, să se asigure o încadrare a 20% din loturile studiate.

Cu datele calculate, conform precizărilor făcute mai sus, s-a întocmit tabelul 3, în care pentru comparație, se dau și limitele actuale din STAS 1808—62 pentru fiecare clasă de calitate, corespunzător metodei de analiză aplicate conform STAS 1908—65.

D CONCLUZII ȘI CONSECINȚE PRACTICE

Rezultatele obținute în cadrul cercetărilor permit tragerea următoarelor concluzii mai importante:

— Metoda colorării cu tetrazoliu, admisă pe plan internațional, poate fi aplicată la un număr destul de mare de specii forestiere, prin aceasta sporindu-se exactitatea analizelor.

— În afară de speciile menționate în normele I.S.T.A.-1966 s-a mai pus la punct tehnica de lucru pentru încă 4 specii și anume: *Cornus mas*, *Cornus sanguinea*, *Euonymus europaea* și *Ligustrum vulgare*.

— Cercetările au scos în evidență necesitatea diferențierii timpului de înmuiere în apă și de tratare cu tetrazoliu pentru semințele proaspete și semințele vechi (cu o vechime mai mare de 3—5 luni) pentru a se obține o colorare clară. În general, muierea în apă va fi de 24 ore pentru semințele proaspete și 48 de ore pentru cele vechi, iar tratarea cu tetrazoliu va fi de 24 ore pentru semințele proaspete și de 30 sau 48 ore pentru cele vechi. În normele I.S.T.A. nu se fac diferențieri, funcție de vechimea semințelor.

— Față de tehnica de lucru prevăzută în normele I.S.T.A. se propun unele modificări la pregătirea semințelor, care, în cercetările noastre, s-au dovedit eficiente pentru asigurarea unei bune difuzii a soluției de tetrazoliu în țesuturi și o clasificare clară a embrionilor viabili și neviabili. Aceste modificări se referă la analiza semințelor de *Acer campestre*, *Carpinus betulus*, *Corylus avellana*, *Fagus sylvatica*, *Tilia sp.*, iar pentru *Acer tataricum* s-a precizat în întregime tehnica de lucru, în normele I.S.T.A. neexistând o tehnică diferențiată la această specie, față de celelalte acerinee.

— La speciile pentru care STAS 1908—65 prevede determinarea potenței germinative prin colorare cu indigo carmin, rezultatele ce se obțin folosind colorarea vitală cu tetrazoliu sînt în general apropiate (brad, alun, fag, frasin, lemn ciinesc, măr, păr, cireș).

— La speciile pentru care STAS 1908—65 prevede determinarea potenței germinative prin secționare, rezultatele ce se obțin folosind colorarea cu tetrazoliu sînt diferite, valorile obținute fiind mai mici (acerinee, corn, sînger, carpin, păducel, salbă, măceș, tei). Aceste diferențe se accentuează la semințele cu o vechime mai mare de 3—5 luni (mai ales la semințele recoltate incomplet coapte) pentru care aspectul în secțiune al semințelor nu poate da informații

sigure asupra vitalității lor (mai ales la acerinee și tei argintiu). De asemenea la semințele rezultate din fructe cărnoase (păducel, măceș, salbă, corn, sînger) o prelucrare defectuoasă soldată cu pierderea vitalității semințelor este foarte bine pusă în evidență la testul cu tetrazoliu și trece neobservată la analiza prin secționare, modificările cromatice ale semințelor fiind neînsemnate.

— Indicii calitativi stabiliți pentru potența germinativă determinată prin metoda colorării cu tetrazoliu diferă în limite largi de cei existenți în STAS 1808 — 62 la speciile pentru care potența germinativă se determină prin secționare. Pentru speciile la care actuala metodă de analiza este colorarea cu indigo carmin indicii calculați cu datele obținute prin metoda cu tetrazoliu sînt, de cele mai multe ori, foarte apropiați. De remarcat că la brad limita inferioară a calității I este mai mare, datorită clarității mai mari a determinării cu tetrazoliu. De asemenea indicii propuși pentru frasin sînt mai mici decît cei actuali, în parte și datorită faptului că la aprecierea vitalității semințelor prin această metodă se ia în considerare atît embrionul cît și endospermul.

— Rezultatele obținute din cercetări pot fi folosite la revizuirea standardelor 1908—65 și 1808—62 pentru introducerea datelor tehnice privind determinarea potenței germinative prin colorare cu tetrazoliu, precum și pentru introducerea indicilor calitativi corespunzători metodei colorării cu tetrazoliu.

Folosirea metodei cu tetrazoliu la determinarea potenței germinative a semințelor permite a se renunța la semințele de proastă calitate neidentificabile ca atare prin secționare și astfel se înlătură cheltuielile inuile ocazionate de semănare, întreținere și udare pînă la răsărire.

— Pentru semințele care se exportă, buletinul de analiză internațional eliberat de laboratoarele afiliate I.S.T.A. se bazează pe utilizarea exclusiv a metodelor prescrise în normele elaborate de această asociație. La determinarea capacității germinative a semințelor sînt admise numai metoda fiziologică (determinarea germinației tehnice) și testul cu tetrazoliu. Precizările aduse de cercetările noastre, la analiza cu tetrazoliu, pot fi utile în activitatea acestor laboratoare.

BIBLIOGRAFIE

1. A t a y, I. „The application of biochemical Test (with Tetrazolium) to the seeds of some turkish forest trees species“. Istanbul Univ. Orm. Fak. Derg. 1966, 16 A (1), p. 69—86 (in Forestry Abstracts 1967, vol. 28 — nr. 3—3707). Al 6-lea Congres forestier mondial, Madrid, 1966.
2. B a r t o n, L. „Seed Preservation and Longevity“ p. 110—138. London-New-Jork, 1961.
3. B u l a t, H. „Reduktionsvorgänge in lebendem Gewebe, Formazane Tetrazoliumsälze und ihre Bedeutung als Redoxindikatoren in ruhenden. Samen“, Comptes rendus de l'Assoc. Internat. d'Essais de Semences vol. 26, nr. 4(686—692), 1961.
4. B u l a t, H. „Keimversuche, Triebkraftversuche und Tetrazoliumprüfungen mit Samen, von Gossypium spp“. Comptes rendus de l'Association Internat. d'Essais de Sem. vol. 27, nr. 3, pp. 779—794, 1962.
5. B u l a t, H. „Das allmähliche, durch ungünstige Lagerungsbedingungen Beschleunigte Absterben des Samen bzw. Rückgang der Keimfähigkeit im Bilde des topogra-

phischen, Tetrazoliumverfahrens". Comptes rendus de l'Assoc. Internat. d'Essais de Sem. vol. 28 nr. 4, p. 713—751, 1963.

6. Bulat, H., Lindenbein, W. " — Zwanzig Jahre Erfahrung mit der Tetrazoliummethode an Gehölzsamen". Comptes rendus de l'Association Internat. d'Essais de Semences, vol. 26, nr. 3 pp. 453—471, 1961.
7. Buszewicz, G., Holmes, G. D. „Seven years seed testing experience with the Tetrazolium viability Test for conifer seeds". Rep. For. Res. For.—Comm. Lond pp. 142—151, 1956/57.
8. Cabial, J. F., Cruz, M. R. „The Topographical Tetrazolium Method for Determining Germinating Capacity of *Lupinus luteus* L.". Comptes rendus de l'Association Internat. d'Essais de Semences, vol. 25, nr.1, p. 474—483, 1960.
9. Constantin, A., Varga, D. „Cercetări privind determinarea viabilității semințelor de brad (*Abies alba* Mill) cu ajutorul sărurilor de tetrazoliu". Revista Pădurilor 11, pp. 636—639, 1963.
10. Cristescu, V., Ocskay, S. și colaboratorii „Stabilirea indicilor calitativi ai semințelor pentru 77 specii forestiere". Analele ICES vol. XVIII, p. 11—45, 1957.
11. Evrard, R. „Contribution à l'étude des propriétés germinatives de graines par la méthode au chlorure de 2,3,5, — tripheniltetrazolium" Bull. Inst. Agron. et. Stat Rech. Gembloux 23, nr, 1, p. 49—54, 1953.
12. Germ, H. „Raport of Activitie of the Commitee for the Tetrazolium Test (1956—1959)", Comptes rendus de l'Association Internationale d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 1. pag. 492—497, 1960.
13. Gheorghiu, V., Alexa — Petrovanu, M. — „Determinarea puterii de germinare a semințelor cu ajutorul sărurilor de tetrazoliu". Studii și cercetări de chimie nr. 34. Iași, 1934,
14. Giurgiu, V. „Aplicarea statisticii matematice în silvicultură". Editura Agrosilvică, 1966.
15. Hilf, R., Rohmeder, E. „Untersuchungen über das Verhalten von Tetrazoliumchlorid bei der Keimfähigkeitsprüfung forstlicher Sämerein". Forstwiss, Cbl.nr. 9—10 p.279—292, 1955.
16. Holmes, G. D. „Raport of the forest seeds commitee for the period 1962—1965". Comptes rendus de l'Association internationale d'Essais de Semences, vol. 30, nr. 2, pag. 349—368, 1965.
17. Kietreiber, M. „Uber Differenzen zwischen TTC-und Keimfähigkeitswert bei *Zea mais*." Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 1, pp. 467—473, 1960.
18. Lăzărescu, C., Ocskay S. „Contribuții la stabilirea indicilor calitativi ai semințelor de molid." Studii și cercetări ICES vol. XIII, p. 55—68, 1953.
19. Lăzărescu, C. „Date biometrice în standardizarea semințelor forestiere". Rev. păd. 3., p. 157—159, 1957
20. Lindenbein, W., Bulat, H. „Grundsätzliches zum Tetrazolium test". Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 1, pp. 449—451, 1960.
21. Lindenbein, W., Bulat, H. „Beiträge zur topographischen Tetrazoliummethode I. Forstliches Saatgut". Compes rendus de l'Association Internationale d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 11, pp. 452—459, 1960.

22. Lindenbein, W., Bulat H. „Beiträge zur topographischen Tetrazolium — methode. II; Einige Versuchergebnisse mit künstlich getrockneten Spinatsamen“. Comptes rendus de l'Association internationale d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 1, pp. 460—462, 1960.
23. Lindenbein, W., Germany, F. R. „Raport of the activities of the Tetrazolium test committes (1959—1962). Comptes rendus de l'Asoc. Internat. d'Essais de Sem., vol. 27 nr. 1, p. 224—234.
24. Lindenbein, W. „Tetrazolium testing“ Comptes rendus de l'Association Internationale d'Essais de Semences, vol. 30, nr. 1, pp. 89—97, 1965.
25. Linnik, E. T. „Metode rapide de determinare a facultății germinative a semințelor specilor lemnoase“. Lesnoe hozeastvo 1, 1959, p. 85—88 (in Revista de Referate Silv. 3, 1959).
26. Lovato, A., Amaducci, M. T. „Examination of the problem of Whether dormancy exists in seeds of onion (*Allium cepa* L) and leek (*Allium porrum*) I. A. comparative test of different Tetrazolium test techniques“. Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 29, nr. 1, p. 17—26, 1964.
27. Marin, A. „Metode biochimice pentru determinarea capacității de încolțire a semințelor. Fenomene fiziologice evidențiate pe cale chimică. „Chimie, Fizică, Radio, supliment lunar al ziarului Științelor, martie, pp. 13—15, 1948.
28. Moore, R. P. „Tetrazolium as a universsaly acceptable Quality Test of Viable Seed“. Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences vol. 27, nr. 3, p. 795—805, 1962.
29. Moore, R. P. „Previous history of seed lots and differential maintenance of seed viability and vigor in storage, „Comptes rendus de l'Assoc. Internat. d'Essai de Sem, vol. 28 nr. 4, pp. 691—698, 1963.
30. Moore, R. P. „History supporting Tetrazolium seed testing “15 the Internationa Seed Testing Congres, Bew Zealand, Preprint 36, 1968.
31. Schubert, J. „TTC — Reduktionsaktivität und Keimvermögen temperaturgeschädigter Samen vom Robinia pseudacacia L“. Comptes rendus de l'Association internationale d'Essais de Semences, vol. 26, nr. 3, pp. 472—503, 1961.
32. Schubert, J. „Zur Bedeutung des Aziditätsgrades bei der Qualitätsbeurteilung von Saatgut nach dem topographischen Tetrazoliumverfahren“, Fachzeitschrift für Samen und Samten nr. 3, pp. 78—81 și nr. 4, pp. 110—112, 1961.
33. Schubert, J. „Vergleichsuntersuchungen zur Prüfung der Excised-Embryo — Methode an Hand des Keimund Tetrazoliumtests bei *Fraxinus excelsior*, *Prunus avium* und *Pinus monticola*“. Comptes rendus de l'Assoc. Internat. d'Essais de Semences vol. 30, nr. 4, pp. 821—859, 1965.
34. Simak, M., Kamre, S. K. „Comparative studies on scots pine seed germinability with Tetrazolium and X-ray contrast metods“. Comptes rendus de l'Association international d'Essais de Semences, vol. 28, nr. 1, pp. 3—18, 1963.
35. Verhey, C. Die Unbrauchbarkeit des Tetrazolium Verfahren zur Prüfung von durch Trocknung verletzten Saatgut“. Comptes randus de l'Association Internationale d'Essais de Semences vol, 22, nr. 1, pp. 321—329, 1957.

36. Wharton, M. J. „The Use of the Tetrazolium Test for Determining the Viability of Grass Seeds“. Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 20, nr. 1, pp. 71—80, 1955.
37. Wharton, M. J. „The Use of the Tetrazolium Test for Determining the Viability of Seed of the Genus Brassica“. Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 20, nr. 1, pp. 81—88 1955.
28. * * * „Règles International pour les Essais de Semences“. Comptes rendus de l'Association International d'Essais de Semences, vol. 25, nr. 4, pp. 997—1121, 1960.
39. * * * „STAS 1908-65: semințe de arbori și arbuști pentru culturi forestiere. Metode de analiză, 1965.
40. * * * „International Rules For Seed Testing 1966“. Comptes rendus de l'Assoc. Internat. d'Essais de Sem. vol 31, 1, 1966.

IV RECHERCHES SUR L'EMPLOI DU TÉTRAZOLIUM À LA DETERMINATION QUALITATIVE DES SEMENCES

Resumé

Pour 25 espèces forestières d'arbres et arbustes, on a effectué des analyses parallèles pour la détermination du pouvoir germinatif par coloration au tétrazolium et par la méthode prévul par le STAS 1908-65 (sectionnement ou coloration à l'indigo carmin). Les recherches portèrent sur des semences fraîches, comme aussi sur des semences récoltées plus de 3—5 mois auparavant. Les semences avaient été récoltées sur l'entière territoire de notre pays et appartinrent aux récoltes 1965, 1966 et 1967..

À l'aide des données obtenues, on a calculé, pour 20 espèces, les indices qualitatives correspondants au pouvoir germinatif déterminé par la coloration au tétrazolium.

Des recherches entreprises se détachent les suivantes conclusions:

— Le méthode de coloration au tétrazolium peut être appliquée à un grand nombre d'espèces forestières, ce qui rend les analyses plus exactes. En dehors des espèces mentionnées par les normes ISTA — 1966, on a mis au point la technique de travail pour encore 4 espèces, nommément *Cornus mas* L., *Corpus sanguinea* L., *Euonymus europaea* L. et *Ligustrum vulgare* L.

— Pour obtenir une coloration claire à l'analyse au tétrazolium, il est nécessaire, de différer le temps de trempage dans de l'eau et de traitement au tétrazolium pour les semences fraîches comme pour les semences anciennes (dont l'ancienneté dépasse 3—5 mois). En général, pour les semences anciennes, le temps de trempage et de traitement au tétrazolium sera double, mais il existe aussi des variations selon l'espèce.

— Etant données les indications des normes ISTA, on a proposé certaines modifications de la technique de préparation des semences pour l'analyse au tétrazolium chez les espèces: *Acer campestre* L., *Carpinus betulus* L., *Corylus avellana* L., *Fagus sylvatica* L., *Tilia* sp. Ces modifications ont prouvé leur efficacité pour assurer une bonne diffusion de la solution de tétrazolium dans les tissus. On a aussi précisé la technique de travail pour l'*Acer tataricum* L.

— Le pouvoir germinatif déterminé par la coloration au tétrazolium se rapproche de celui qu'on obtient par la coloration à l'indigo carmin, mais diffère beaucoup du pouvoir germinatif déterminé par le sectionnement. Chez les vieilles semences, ces différences s'accroissent, car les semences ayant perdu leur vitalité ne changent pas de couleur et de ce fait ne peuvent pas être classifiées comme telles à l'analyse par sectionnement.

— Les indices qualitatifs établis pour le pouvoir germinatif déterminé moyennant la coloration au tétrazolium diffèrent dans de larges limites des indices établis par le STAS 1808-62 chez les espèces pour lesquelles on utilise le sectionnement et sont rapprochés pour les espèces pour lesquelles on utilise la méthode de coloration à l'indigo-carmin.

Les résultats des recherches peuvent être employés à la révision des normes 1908-65 (méthode d'analyse) et 1808-62 (conditions techniques).

— L'emploi de la méthode de la coloration au tétrazolium à la détermination du pouvoir germinatif des semences, nous permet de renoncer à l'emploi des semences de mauvaise qualité non identifiables comme telles par le sectionnement.

IV TESTS ON UTILIZATION OF TETRAZOLIUM SELTS IN DETERMINATION OF SEED QUALITY

Summary

For 25 tree and shrub forest species, simultaneous analyses were made to determine their germinative potential, through coloration by means of tetrazolium and by the method indicated in the STAS 1908-65 (cutting or coloration with carmine indigo). Researches were carried out as well on fresh seeds as on seeds older than 3—5 months. Seeds were collected from the entire our country's territory and appartained to the crops 1965, 1966 and 1967.

On hand of the obtained data, were calculated, for 20 species, the qualitative values corresponding to the germinative potential determined through coloration by means of tetrazolium

The research results led to following conclusions:

— The Tetrazolium test can be applied in a great number forest species, increasing the precision of the analyses. Besides the species mentioned in ISTA — Rules 1966 the working technics was stated for the following 4 species: *Cornus mas* L., *Cornus sanguinea* L., *Euonymus europaea* L. and *Ligustrum vulgare* L.

To obtain a clear coloration at the tetrazolium test, it is necessary to differentiate the water soaking and the tetrazolium treatment for the fresh and for the old seeds (older than 3—5 months). Generally, for older seeds, the water soaking and tetrazolium treatment time will be double, varying depending on the species.

— Given the indications in the ISTA-Rules some modifications in the preparatory technics of seeds to the tetrazolium tests were proposed for *Acer campestre* L., *Carpinus betulus* L., *Corylus avellans* L., *Fagus sylvatica* L., *Tilia* sp. These modifications proved their efficacy to assure a good diffusion of the tetrazolium solution into the tissues. Working technics for *Acer tataricum* L. were specified too.

— The germinative potential determined through coloration by tetrazolium is comparable with the germinative potential obtained by means of coloration with carmine indigo, however greatly from the germinative potential determined by the cutting method. In old seeds, these differences emphasize, because seeds which lost their vitality do not modify their colour and cannot be classified as such by the analysis by means of the cutting method.

— The qualitative values stated for the germinative potential determined by tetrazolium coloration differ in large limits from the values included in STAS 1808-62 for the species for which the cutting method is to be applied; these values are similar in species for which the method of indigo carmine coloration is utilised. Tests results can be utilized in revision of the standards 1908-65 (analysis method) and 1808-62 (technical conditions).

— The method of the tetrazolium coloration in determining the germinative potential of seeds, allows to renounce the utilization of bad seeds which cannot be identified as such through the cutting method.