

Die Tetrazolium Working Sheets, Methodenentwicklung und Aufnahme neuer Arten in die ISTA-Vorschriften

S. KRÄMER, A. JONITZ und N. LEIST

Das Topographische Tetrazoliumverfahren

Mit dem Topographischen Tetrazoliumverfahren ist eine rasche und genaue Bestimmung der Lebensfähigkeit von Samen möglich. Selbst bei ruhenden Samen liefert die Lebensfähigkeitsprüfung zuverlässige Information über den Beschaffenheitszustand von Samen in kurzer Zeit. Daher wird sie besonders bei solchen Arten eingesetzt, bei denen eine Bestimmung der Keimfähigkeit sehr eilig, sehr schwierig ist oder sich über längere Zeit hinzieht.

Bei dieser biochemische Methode diffundiert das Triphenyltetrazoliumchlorid nach einer Präparation der Samen in die Gewebe und wird in lebenden Zellen durch Elektronen aus der Atmungskettenreaktion zum rotgefärbten Formazan reduziert. Somit können lebende Gewebe von den ungefärbt verbliebenen toten Geweben differenziert werden (Abbildung 1). Zur Beurteilung von Samen als lebensfähig gibt es artspezifische Auswertungsschemata die das Mindestausmaß und die Lage von gefärbtem, lebendigem Gewebe anzeigen.

Für die Durchführung des Topographischen Tetrazoliumtests liegen die ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing in zwei Bänden vor. Volume I beinhaltet dabei 126 Arten aus 30 verschiedenen

Familien von landwirtschaftlichen- Gemüse- und gärtnerischen Arten, während Volume II 119 Gattungen von Gehölzarten aus 44 Pflanzenfamilien umfasst.

ISTA Tetrazolium Working Sheets

Wie am Beispiel des Arbeitsblattes für *Abies* (Abbildung 2) zu sehen, sind alle erforderlichen Schritte übersichtlich auf einer Seite dargestellt, die Seiten sind

alphanumerisch sortiert, damit Ergänzungen eingefügt werden können.

Die Schemazeichnungen der ganzen Samen zeigen die Lage der einzelnen Gewebebereiche in einheitlicher Farbsymbolik. Dabei sind die embryonalen Gewebe weiß, die Nährstoffspeicherewe Endosperm und Perisperm gelb, die Samenschalen blaugrün und die Fruchtschalen braun.

1. Species / Genus	Abies , Pinaceae; Fir, Tanne
	Seed tissue (longitudinal section)
2. Instruments	Beakers (4 x 50 ml), dissecting needle, filter paper, forceps, scalpel, support for preparation (rubber), support for evaluation, alcohol for cleaning
3. Pretreatment	None
4. Preparation before staining	Prepare the dry seeds. Cut transversely at both ends, to open embryo cavity. Incubate seeds in TZ solution by the following treatment: Treat TZ imbibed seeds 3 x 10 minutes with low pressure
5. Staining	18 hours, 30°C, 1,0 % TZ-solution
6. Preparation for evaluation	Cut longitudinally through endosperm, expose embryo, remove seed coat
7. Evaluation (maximum area of unstained, flaccid and/or necrotic tissue permitted)	None, except small superficial necrosis on the outer part of the endosperm, not in connection with embryo cavity
8. Remarks	Old and dry seeds may give more consistent results if imbibed for 48 hours Alternative method explained in the ISTA-Rules Table 6A

Fig. 1: Preparation step (s)

Fig 2: Evaluation, examples of none viable seeds.



Abbildung 1: Tetrazoliumtest bei *Prunus*, oben lebensfähige Samen, unten nicht lebensfähige Samen

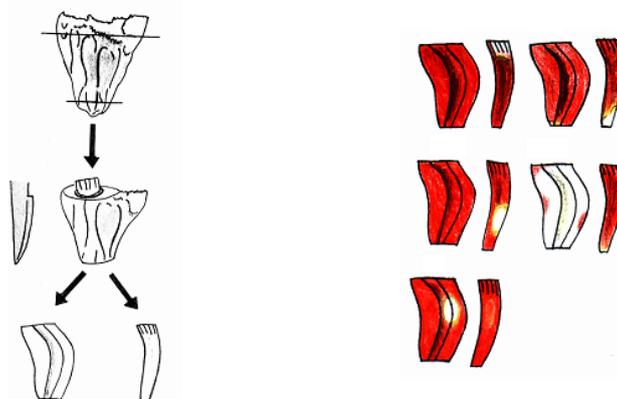


Abbildung 2: ISTA Tetrazolium Working Sheet *Abies*

Autoren: Stefanie KRÄMER, Andrea JONITZ, Norbert LEIST, Referat Saatgutuntersuchung und Angewandte Botanik, LTZ Augustenberg, Neßlerstraße 23, D-76227 KARLSRUHE

Dem Saatgutprüfer wird somit schon vor dem ersten Arbeitsschritt vor Augen geführt in welche Gewebebereiche er eingreift. Somit kann er abschätzen wo genau Wundreaktionen zu erwarten sind und ist in seiner Beurteilung sicher.

Ebenso sind die Richtlinien zur Präparation als Skizzen dargestellt bei denen die Schnittführung für jeden Präparationsschritt eingezeichnet ist.

Beispielhaft werden jeweils Färbefelder von nicht lebensfähigen Samen aufgezeigt.

Die bei allen Arten möglichst kurz und gleichförmig gehaltenen Beschreibungen umfassen eine Auflistung der erforderlichen Arbeitsmittel und alle erforderlichen Arbeitsschritte wie die Vorbehandlung, Präparation, Färbung,

detaillierte Vorschriften zur Beurteilung sowie Bemerkungen.

Aufnahme von Methoden in die ISTA Vorschriften

Für die Aufnahme neuer Arten in die verbindlich geltenden ISTA Vorschriften bedarf es jedoch der Methodenvalidierung. Die Vorgehensweise bei der Eingabe neuer Methoden beginnt mit der Antragstellung zur Aufnahme einer Methode in die ISTA-Rules beim Vorsitzenden des entsprechenden Komitees. Nimmt das Komitee den Vorschlag an, so erfolgt die Erarbeitung und Validierung der Methode in Vergleichsuntersuchungen. Fällt die Validierungsstudie positiv aus, so wird im entsprechenden Komitee über die Aufnahme der Methode abgestimmt und die Zustimmung über das ISTA

Sekretariat an den Methodenausschuss weitergereicht, der die Vereinbarkeit mit den Vorschriften prüft und die endgültige Formulierung bestimmt. In der darauffolgenden Vollversammlung der Vereinigung wird die Methode in die ISTA-Rules aufgenommen. Wird die Annahme des Vorschlages in einer der Prozessstufen abgelehnt, so besteht die Möglichkeit eine revidierte Fassung erneut beim Vorsitzenden des Komitees einzureichen (*Abbildung 3*).

Als methodische und fachliche Vorlagen für Arten, die noch nicht in den ISTA-Rules beschrieben sind, dienen das ISTA Tetrazolium Handbuch von Moore - mit umfassenden Literaturangaben -, die ISTA Tetrazolium Working Sheets, das AOSA Tetrazolium Handbuch sowie die einschlägige Bestimmungsliteratur und Internetquellen.

Bei der Methodenoptimierung sind die unterschiedlichen Einflussparameter für die einzelnen Samenarten abzustimmen. So wurde die im ISTA Tetrazolium Handbuch von Moore beschriebene Methode für die Lebensfähigkeitsbestimmung von *Carthamus* optimiert, indem die einzelnen Arbeitsschritte überprüft wurden.

Vorgehensweise bei der Methodenentwicklung

Zunächst muss die Samenmorphologie überprüft werden - ist Endosperm oder Perisperm vorhanden oder handelt es sich um Samen ohne Nährgewebe. Wie soll die Präparation erfolgen, in trockenem oder in vorgequollenem Zustand? Wo und wie ist der Same zu öffnen, damit die Tetrazoliumlösung bestmöglichst in alle relevanten Gewebe eindringen kann? (*Abbildung 4*)

Wie konzentriert muss die Tetrazoliumlösung sein und wie ist die Kombination aus Temperatur und Zeit beim Färbevorgang zu wählen, um ein optimales Färbefeld zu erhalten? Unzureichend ebenso wie zu intensiv gefärbte Gewebe können beim wenig erfahrenen Saatgutprüfer zu fehlerhaften Beurteilungen führen. Die Unterscheidung von lebensfähigen und von nicht lebensfähigen Samen muss klaren Richtlinien folgen. *Abbildung 5* zeigt einen nicht lebensfähigen Samen aufgrund nekrotischer Wurzeln und Kolyledon-Schäden im Übergangsbereich von der Wurzel zu den Keimblättern

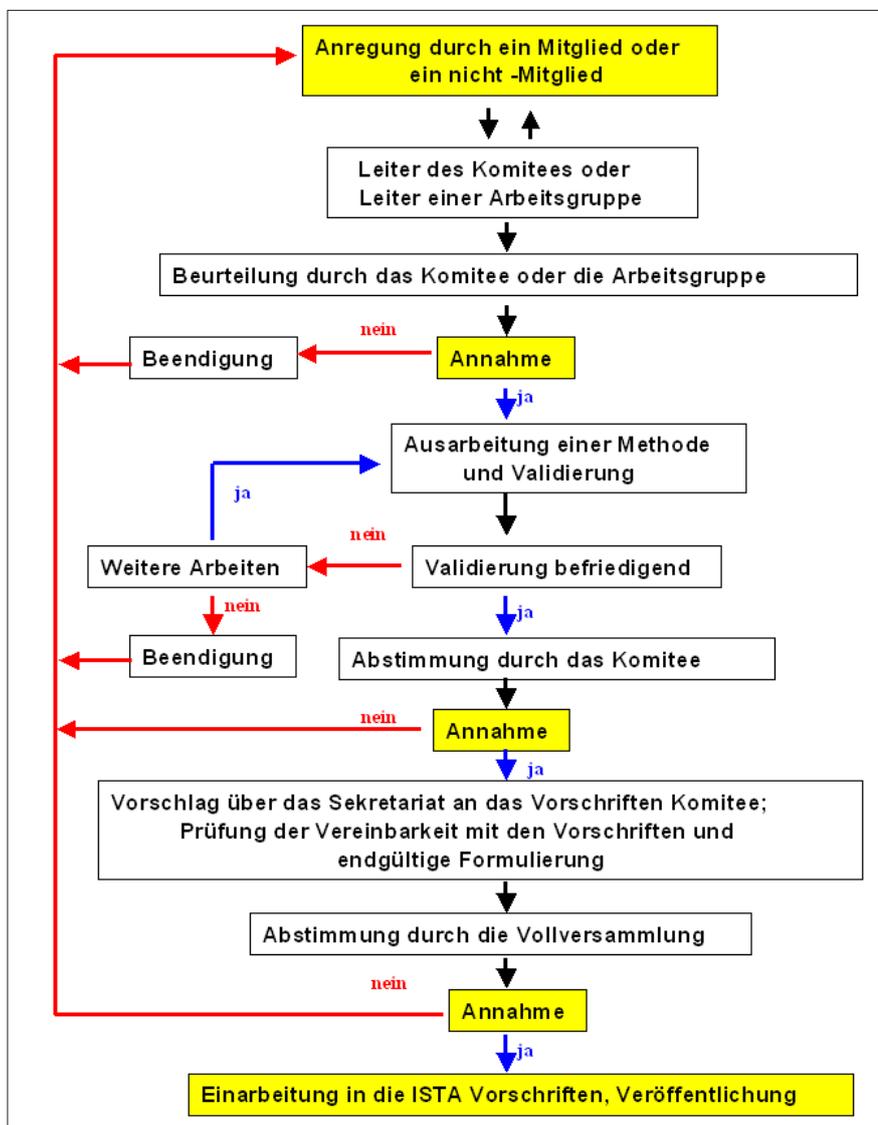


Abbildung 3: Vorgehensweise bei der Einbringung von Methoden in die ISTA Vorschriften

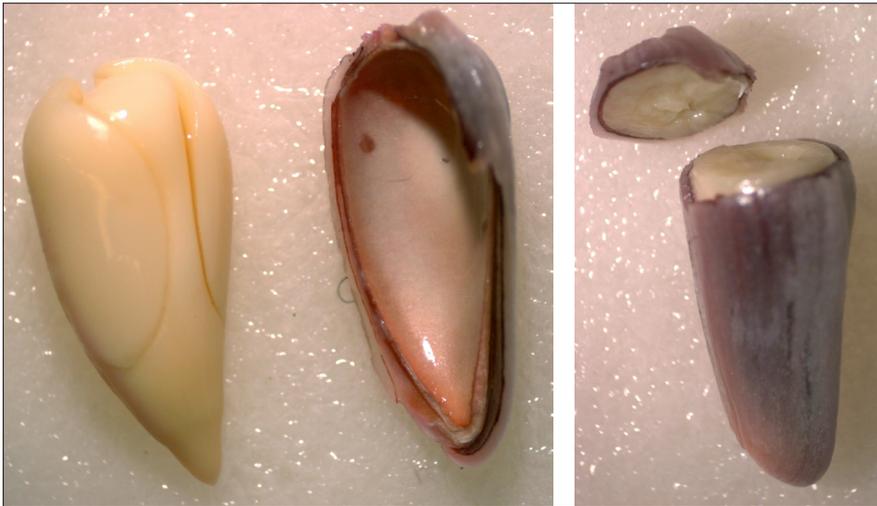


Abbildung 4: Optimierung der Präparationsmethode bei *Carthamus*, Öffnung des Samens in Längs- oder Querrichtung

(Abbildung 5). Ist eine Methode so im Detail beschrieben, wird der Methodenentwurf zur Aufnahme in die ISTA-Rules eingereicht.

ISTA Validierungsstudie bei Tomate, *Lycopersicon esculentum*

Im Folgenden wird das aktuelle Verfahren der Aufnahme des Topographischen Tetrazoliumtests für Tomate, *Lycopersicon esculentum* in die ISTA Vorschriften beschrieben.

Im Oktober 2006 wurde durch das Tetrazoliumkomitee beschlossen, die Methode zur Lebensfähigkeitsbestimmung bei Tomate in die ISTA-Rules aufzunehmen. Eine Methode lag bereits in den ISTA Working Sheets vor, sodass nur noch eine Validierung der Methode erfolgen musste. Die Organisation dieser Aufgabe wurde von Herrn Dr. HERR, Universität Hohenheim zusammen mit der Vorsitzenden des Tetrazoliumkomitees Frau KRÄMER, LTZ Augustenberg übernommen.

Als erster Schnitt war die Planung der Validierungsstudie im Hinblick auf die statistische Auswertung erforderlich. Nach der Materialbeschaffung im Januar 2007, die vier Proben unterschiedlicher Qualität umfasste, musste dieses auf seine Eignung mit jeweils 4 x 100 Samen voruntersucht werden.

Danach konnten 9 Labore weltweit für die Teilnahme an dem Ringuntersuchungen gewonnen werden, an welche Mitte Februar die Proben verschickt wurden. Die Untersuchung musste bei allen vier Qualitäten an jeweils 4 x 100 Samen erfolgen, der Ergebnisbericht sollte Ende März vorliegen, sodass die statistische Auswertung bis Oktober 2007 abgeschlossen werden konnte.

Die Beurteilung der Validierungsstudie im Tetrazoliumkomitee einschließlich Abstimmung erfolgte im November 2007, sodass der Termin zum Einreichen von Methodenvorschlägen zur Abstimmung bei der folgenden Vollver-



Abbildung 5: Beurteilung des Färbefildes, Schaden an der Wurzel und am Übergangsbereich zu den Kotyledonen

sammlung beim ISTA Sekretariat, im November 2007, eingehalten werden konnte.

Nach erfolgreicher Abstimmung über die Methode bei der ISTA Vollversammlung im Juni 2008 wird die Methode in die ISTA-Rules aufgenommen und steht somit als weitere Methode für die Ausstellung von Tetrazoliumergebnissen bei Tomate auf ISTA Zertifikaten zur Verfügung.

Literatur

- ANONYMUS, 2006: Internationale Vorschriften für die Prüfung von Saatgut, Internationale Vereinigung für Saatgutprüfung, P.O. Box 412, 8042 Zürich, Schweiz.
- GRABE, D.F., ed., 1970: Tetrazolium testing handbook for agricultural seeds. Association of Official Seed Analysts, US, Contribution 29.
- MOORE, R.P. ed., 1986: Handbook on Tetrazolium testing. International Seed Testing Association, Zürich.
- LEIST, N., S. KRÄMER and A. JONITZ, 2003: ISTA Working Sheets Vol. I and II International Seed Testing Association, Zürich.

