

Primjena fenolnog testa u ispitivanju sjemenske čistoće gen kolekcije pšenice

Pavlic, Leona

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:541479>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Leona Pavlic

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede

Smjer Hortikultura

**Primjena fenolnog testa u ispitivanju sjemenske čistoće gen
kolekcije pšenice**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Leona Pavlic

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede

Smjer Hortikultura

**Primjena fenolnog testa u ispitivanju sjemenske čistoće gen
kolekcije pšenice**

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Leona Pavlic

Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede

Smjer Hortikultura

**Primjena fenolnog testa u ispitivanju sjemenske čistoće gen
kolekcije pšenice**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu završnog rada:

1. doc.dr.sc. Sonja Petrović, mentor
2. prof.dr.sc. Sonja Vila, član
3. prof. dr.sc. Vlado Guberac, član

Osijek, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Poljoprivredni fakultet u Osijeku
Preddiplomski sveučilišni studij Poljoprivrede, smjer Hortikultura
Leona Pavlic

Završni rad

Primjena fenolnog testa u ispitivanju sjemenske čistoće gen kolekcije pšenice

Sažetak:

Najvažnije svojstvo sjemenske kvalitete jest njegova genetska čistoća. Genetska čistoća odnosi se na postotak onečišćenja sjemenom ili genetskim materijalom drugih kultivara ili vrsta. Kontrola čistoće kultivara osim fenotipskih i molekularnim metodama provjerava se i kemijskim metodama. U radu je provedena kemijska metoda određivanja čistoće sjemenskoga materijala fenolnim testom. Korištena je metoda je preuzeta i odrađena prema UPOV-om pravilniku za DUS ispitivanja pšenice. Metoda se temelji na obojenosti perikarpa pšenice te procjeni ujednačenosti obojenih zrna. U radu je ispitivano 20 genotipova pšenice. Očitavanje obojenosti se temeljilo na skali od 0 do 9, pri čemu su svi genotipovi pokazivali određen stupanj obojenosti perikarpa. Ocjene obojenosti su se kretale od 1 (jedan genotip) do 9 (osam genotipova). Ujednačenost obojenja je bila u prihvatljivom rasponu te su svi genotipovi ocijenjeni kao genetski čisti.

Ključne riječi: pšenica, genetska čistoća, fenolni test, UPOV, DUS

20 stranice, 3 tablica, 20 slika, 16 literaturnih navoda

Završni rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agriculture
Undergraduate university study Agriculture, course Horticulture
Leona Pavlic

BSc Thesis

Application of phenol test for seed purity examination od wheat gen -collection

Summary:

The most important feature of the seed quality is its genetic purity. Essentially, genetic purity of seeds ensures plants in the crop desired properties. Genetic purity refers to the percentage of contamination by seeds or genetic material of other varieties or species. In this thesis chemical control method for genetic purity of cultivars using phenol method. The phenol method was concuted according to UPOV guidelines for DUS testing. Method is based on the color quantification of the wheat pericarp and on the assesment of seed color uniformity. Investigation was carried out on 20 different wheat genotypes. Reading of results was measured according to the coloration grade, on a scale from 0 to 9. All genotypes showed certain degree of pericarp coloration. Coloration grades were from 1 (one genotype) to 9 (eight genotypes). Color uniformity of tested seeds was in accetable range thus all genotypes were characterised as genetically pure.

Ključne riječi: wheat, genetic purity, phenol test, UPOV, DUS

20 pages, 3 tables, 20 figures, 16 references

BSc Thesis is archived in Library of Faculty of Agriculture in Osijek and in digital repository of Faculty of Agriculture in Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. MATERIJAL I METODE.....	5
2.1. Biljni materijal	5
2.2. Fenolni test.....	7
2.2.1. Pribor	8
2.2.2. Princip fenolnog testa	9
2.3. Priprema biljnog materijala za fenolni test	9
3. REZULTATI I RASPRAVA	13
4. ZAKLJUČAK	18
5. LITERATURA.....	19

1. UVOD

Biljka koja se uzgaja širom svijeta, jedna od najrasprostranjenijih i najvažnijih kultura je pšenica. Kada govorimo o klasifikaciji pšenice ubrajamo ju u rod jednogodišnjih biljaka iz porodice trava. Stabljika je šuplja, uspravna te sazdana 5-7 nodija s naizmjeničnim listovima. Naraste obično do 65 do 120 cm visine. Na njenom vrhu nalazi se gusti klas. Klasići u klasu sastoje se od pljevice i nekoliko cvjetića. Plod je zrno. Pšenica je autogamna biljka, a stranooplodnja je izražena 1-4%. Pšenica je euritopna biljka, a to joj je svojstvo vrlo izraženo zahvaljujući njezinoj prirodi, a zatim njezinom polimorfizmu. Postoje diploidne ($n=7$, genom A), tetraploidne ($n=14$, genom AB) i heksaploidne ($n=21$, genom ABD) pšenice. Pšenica ima veliki broj vrsta, varijeteta i sorti, koje se dijele na dva osnovna tipa: ozime i jare. Kod nekih sorata klasovi su s osjem (brkulja), a kod drugih bez osja (šišulja). Na području Hrvatske najviše pšenice se uzgaja u Slavoniji i Baranji. Najčešća uzgojena vrsta pšenice je obična krušna pšenica (*Triticum aestivum* L.) (<http://www.plantea.com.hr>).



Slika 1. Pšenica

Foto original: Leona Pavlic

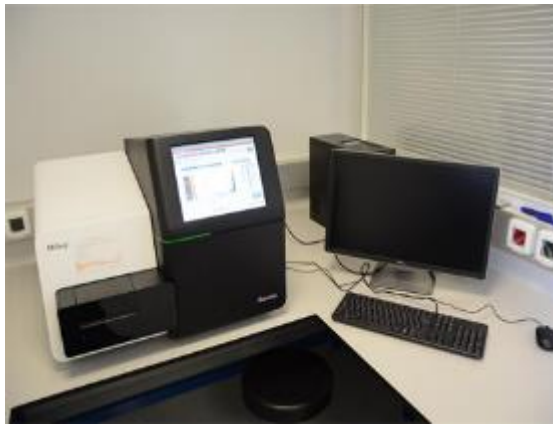
Najvažnije svojstvo sjemenske kvalitete jest njegova genetska čistoća. U suštini genetska čistoća sjemena osigurava biljci u usjevu željena svojstva, koja je kreirao oplemenjivač. Druga važna svojstva kvalitete sjemena koja direktno utječu na rast usjeva su: čistoća sjemena, energija klijavosti, klijavost, životna sposobnost, zdravstveno stanje, fizičke kvalitete sjemena, a uz to sjeme mora imati dobru skladišnu kvalitetu kako bi održalo to svojstvo do sjetve. U osiguravanju genetske čistoće sjemena ili kultivara najvažnije je identifikacija onog genotipa koji pokazuje željena svojstva priznatog kultivara. Za identifikaciju kultivara koji pokazuje željena svojstva potrebna su sustavna i kontinuirana, višegodišnja istraživanja. Potencijalno korisni odabrani genotipovi moraju se ispitati u poljskim uvjetima da bi se prepoznali kultivari s kombinacijom svojstava koja bi predstavljala veliku vrijednost u uzgoju i upotrebi (Kolak, 1989.).

Genetska čistoća odnosi se na postotak onečišćenja sjemenom ili genetskim materijalom drugih sorata ili vrsta. U sklopu Hrvatskog centra za hranu, poljoprivredu i selo, na Zavodu za sjemenarstvo i rasadničarstvo, Odjelu za rasadničarstvo provode se DUS (Distinctness, Uniformity and Stability – različitost, ujednačenost i postojanost) i VCU (Value for Cultivation and Use – gospodarska vrijednost) ispitivanja čistoće oplemenjivačkog materijala. Testovi se provode u skladu s posebnim pravilnikom koje je razvila Međunarodna unija za zaštitu novih biljnih sorti (UPOV -International Union for the Protection of new Varieties). Ocjenjivanje se provodi prema CPVO (Community Plant Variety Office) tehničkim vodičima (Rukavina i sur., 2008.). Nova sorta se uvrštava u Sortnu listu Republike Hrvatske ako zadovoljava sljedeće kriterije u DUS ispitivanju: različitost, ujednačenost i postojanost u odnosu na postojeće već priznate sorte, te parametre u ispitivanju gospodarske vrijednosti (urod i kvalitetu) i ako ima odgovarajuću denominaciju. U DUS ispitivanje uključene su nove sorte odnosno sorte kandidati, sorte referentne kolekcije kao i sorte primjeri. DUS ispitivanja traju najmanje dvije godine te se provode za potrebe postupka priznavanja novih biljnih sorti, za postupak stjecanja oplemenjivačkog prava odnosno zaštitu novih biljnih sorti te za produživanje upisa sorte u pripadajući pravilnik. Metode koje se koriste za ispitivanja su sljedeće: kemijske, biokemijske i molekularne.

Kemijski testovi koje se koriste za DUS ispitivanja su: jod test, alkaloid test, HCL test, FeSO₄ test, NaOH test, KOH izbjeljivač test, peroksid test, fenolni test, te modificirani fenolni test. Kemijski testovi su ponovljivi i brzi te ih je moguće izvesti bez upotrebe skupih

uređaja. Test je relativno jeftin, omogućuje otkrivanje postotka mješavine drugih vrsta. Kada je riječ o molekularnim testovima oni su skupi, komplicirani te je potreba posebna oprema i uređaji za njihovo izvođenje (slika 2). Za njihovu pravilnu izvedbu potrebno je i dugogodišnje iskustvo i izobrazba.

Biokemijski testovi su testovi koji povezuju gene i enzime. Elektroforezu je bitno spomenuti kao potencijalno vrijednu biokemijsku metodu (slika 3). Metoda se lakše izvodi od molekularnih testova no i dalje je puno izvediva i jeftinija kemijska metoda.



Slika 2. Uređaj za molekularne testove čistoće sjemena

Izvor: www.forenzika.hr



Slika 3. Metoda elektroforeze

Izvor: www.dreamstime.com

Fenolnu reakciju je još 1922. godine razradio Pieper. Fenolna reakcija se od tada najviše koristila na pšenici (Agrawal i Karki, 1989.; Singhal i Prakash,1989.). Metoda služi za ispitivanje čistoće sjemena, a temelji se na obojenosti perikarpa. Utvrđeno je da je riječ o monogenskom svojstvu pri čemu se ekspresija gena na fenotipu perikarpa temelji na jačoj ili slabijoj obojenosti. Obojenost se mjeri na skali od 1 do 9, ukoliko je jača obojenost tada je broj bliži broju 9. Jednoličnost i jačina obojenja sjemena očitava se prema UPOV-u pravilniku. Aktualnost kemijskih testova određivanja čistoće sjemenskoga materijala pšenice ukazuju brojan istraživanja od kojih su ona Ukain i sur. (2016.), Eman (2011.) i Kalla (2010.). Osim na pšenici fenoli test se može biti provoditi i na drugim vrstama kao što su riža (Vijayalakshmi i Vijay, 2009.) i stočni sirak (Thangavel i sur., 2005.).

Cilj rada je primjenom fenolnog testa na 20 različitih genotipova ispitati genetsku čistoću sjemena gen kolekcije pšenice.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Biljni materijal

Za istraživanje je odabrana jedna poljoprivredna vrsta, pšenici (*Triticum aestivum L.*) te je na njoj proveden laboratorijski test. Od pšenice je odabrano 20 genotipa koje uključuju genotipove: U1, Žitarka, Matea, Bc Anica (slika 4), Divana, Cerera, Renesansa (slika 5), Mv Karizma, Ludwig, *Triticum compactum*, *Triticum sphaerococcum*, Kavkaz, Perla, Ema, Sana (slika 7), Fiesta, Isenegrain, Prima (slika 6), Gabi i Lucija. Dvjesto zrna od svakoga genotipa dobiveno je iz gen kolekcije Poljoprivrednoga fakulteta u Osijeku, Katedre za genetiku, oplemenjivanje bilja i sjemenarstvo.

Tablica 1. Naziv genotipa pšenice, godina priznavanja i podrijetlo

BR.	NAZIV GENOTIPA	PODRIJETLO	GODINA PRIZNAVANJA	OPLEMENJIVAČKA KUĆA
1.	U1	HRVATSKA	1936.	Poljoprivredni institut Osijek
2.	ŽITARKA	HRVATSKA	1985.	Poljoprivredni institut Osijek
3.	MATEA	HRVATSKA	2005.	Agrigenetics d.o.o.
4.	BC ANICA	HRVATSKA	2010.	Bc Institut Zagreb
5.	DIVANA	HRVATSKA	1995.	Jošt sjeme Križevci
6.	CERERA	HRVATSKA	1993.	Jošt sjeme Križevci
7.	GABI	HRVATSKA	1999.	Agrigenetics d.o.o.
9.	EMA	HRVATSKA	2010.	Agrigenetics d.o.o.
10.	SANA	HRVATSKA	1982.	Bc Institut Zagreb
11.	LUCIJA	HRVATSKA	2001.	Poljoprivredni institut Osijek
12.	FIESTA	HRVATSKA	1998.	Agrigenetics d.o.o.
13.	PRIMA	HRVATSKA	2001.	Bc Institut Zagreb
14.	PERLA	HRVATSKA	1997.	Agrigenetics d.o.o.
15.	<i>Triticum sphaerococcum</i> L.	DIVLJI SRODNICI		
16.	<i>Triticum compactum L.</i>			
17.	RENEANSANSA	SRBIJA	1995.	
18.	MV KARIZMA	MAĐARSKA	2009.	
19.	LUDWIG	AUSTRIJA	1997.	
20.	KAVKAZ	RUSIJA	1972.	



Slika 4. Sorta pšenice Bc Anica

Izvor: www.bc-institut.hr



Slika 5. Sorta pšenice Renesansa

Izvor: www.nsseme.com



Slika 6. Sorta pšenice Prima

Izvor: www.bc-institut.hr



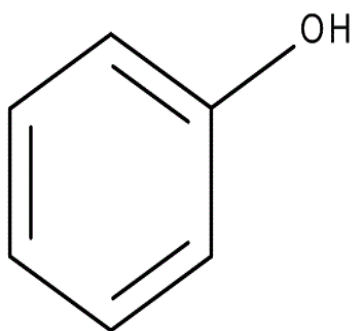
Slika 7. Sorta pšenice Sana

Izvor: www.bc-institut.hr

2.2. Fenolni test

U organskoj kemiji fenoli su skupina spojeva koji se sastoje od hidroksilne skupine (-OH) vezane izravno na aromatski ugljikovodik. Jedna molekula fenola može imati dvije ili više hidroksilnih skupina vezanih za aromatski prsten. Fenoli mogu reagirati s alkalijskim metalima kao i alkoholi, pri čemu nastaju odgovarajući fenoksidi. Male količine fenola nalazimo u ljekovitim pripravcima (kapi za oči ili nos, tekućina za ispiranje usta ili losion za herpes) zbog njihovih baktericidnih i dezinfekcijskih svojstava koja koaguliraju stanične bjelančevine (Rapić, 2002.)

Fenol ili karbolna kiselina, C_6H_5OH , najjednostavniji je spoj iz skupine fenola. Bezbojni kristali karakteristična oštra mirisa, koji se na zraku oboje crveno. Tali se pri $43\text{ }^\circ\text{C}$, topljiv je u alkalijskim otopinama, alkoholu, eteru, kloroformu, sumporougljiku i vrućoj vodi. Otrovan je i djeluje baktericidno. Kao prvi antiseptik od 1865. koristio se u kirurgiji, danas je fenol potpuno zamijenjen drugim sredstvima. No i dalje služi za dezinfekciju. Velike količine karbolne kiseline i drugih fenola služe u kemijskoj industriji za pripremu mnogih aromatskih spojeva (bojila, lijekova, polimernih materijala, eksploziva, mirisa i dr.), pa je fenol ujedno i jedan od najvećih zagađivača industrijskih otpadnih voda (Amić, 2008.).



Slika 8. Kemijska formula fenola

Izvor: www.merckmillipore.com



Slika 9. Fenol

Izvor: www.merckmillipore.com

Fenolni test preporučen je od ISTA (International Seed Testing Association) još 1999. godine. Test je opisan kao brz, jednostavan i pouzdan, visoko je specifičan i mongenski kontroliran. Fenolni test se koristi za ispitivanje sjemenske čistoće, a u ovom radu je korišten za ispitivanje sjemenske čistoće dijela gen kolekcije pšenice Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku. Metodologija primjene fenolnog testa je odrađena prema UPOV- om pravilniku (UPOV, 1996.).

Fenolni test se temelji na kemijskoj reakciji fenola s perikarpom sjemena te je tako moguće dobiti neobojeno ili obojeno sjeme. Osim obojenosti sjemena očitava se i postotak jednolično obojanog sjemenskog materijala pri čemu ona ne smije biti veća od 5% (UPOV (1996) (slika 10).



(a) (b)
Slika 10. Genetski čisto (a) i nečisto (b) sjeme

Izvor: <http://www.authorstream.com>

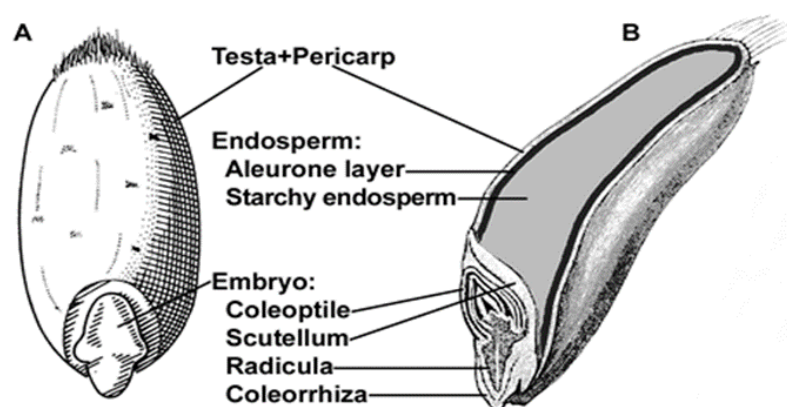
2.2.1. Pribor

Pribor koji je bio potreban za fenolni test je: fenol, pinceta, špric boca, Petrijeve zdjelice, zrna 20 sorata pšenice, ubrus i voda. Zrna pšenice za ovo ispitivanje ne smiju biti tretirana. Sav pribor za rad mora biti čist i uredan. Zbog vlastite sigurnosti nužno je upotrijebiti zaštitnu masku i rukavice prilikom korištenja fenola zbog ranije opisane otrovnosti. Prilikom laboratorijskog pokusa nužno je držati se pravila rada u laboratoriju kako ne bi došlo do

neželjenih i nepredviđenih situacija te kako bi se test mogao provesti u skladu sa zadanom metodom te kako bi rezultati bili primjenjivi.

2.2.2. Princip fenolnog testa

Mono, di ili poli fenol oksidira enzime prisutne u perikarpu, meristemu ili drugim strukturama u sjemenu. Enzim tiroksinaza koristi fenol kao supstrat. Kao rezultat ove enzimske reakcije aktivira se tamno obojenje netopljivog pigmenta melanina s orto kinonom i hidroksil kinonom. Melanin je u pšeničnoj stanici određen jednim genom koji može biti slabije ili jače izražen te o tome ovisi intenzitet obojenja. Reakcija koja uzrokuje obojenje služi kao osnova za grupiranje. Intenzitet obojenja procjenjuje se na skali od 0 do 9. Ocjena 0 je negativno obojenje odnosno nije došlo do obojenja. Postepeno intenziviranje boje kreće se od 1 točnije svijetlo smeđeg do tamno smeđeg obojenja, a ocjenjuje se na skali od 1 do 9.



Slika 11. Građa sjemena pšenice

Izvor: <https://www.obz.hr>

2.3. Priprema biljnog materijala za fenolni test

Prije početka pokusa pripremljen je sav potreban materijal prema UOPV-om pravilniku (tablica 2), koji je uključivao: plastične posudice za natapanje zrna (2x100 zrna od svakog genotipa), običnu vodu, pincetu, ubrus, Petrijeve zdjelice i 2%-tni fenol. Dan prije izbrojano

je 2x100 zrna pšenice od svih 20 genotipova (slika 12). Zrna su zatim natopljena u običnoj vodi (slika 13). Voda je ulivena toliko da budu prekrivena sva zrna u posudicama. Zrna su ostavljena u vodi od 16 do 20h. Ne smiju ostati duže od 20h zato što postoji velika mogućnost proklijavanja sjemena i u tom slučaju pokus nije ispravan i mora se ponoviti. Isto tako moguće je da će zrna upiti svu vodu u posudicama u kojem se ono nalazi u toku tih 16-20h no to nije pogreška i do toga može doći (slika 14).



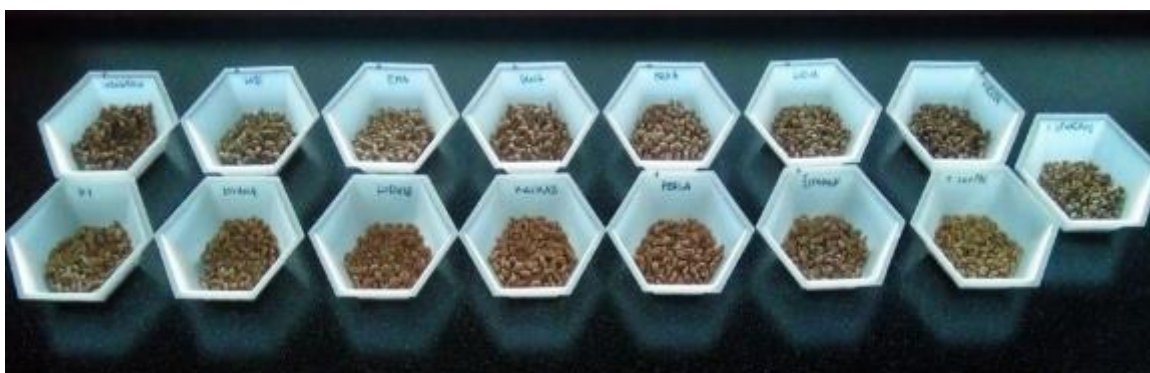
Slika 12. Slaganje zrna pšenice u posude

Foto original: Leona Pavlic



Slika 13. Natapanje genotipova u vodi

Foto original: Leona Pavlic



Slika 14. Genotipovi nakon što su upili vodu

Foto original: Leona Pavlic

Nakon 20h sjemena su izvađena iz posudica i stavljena na ubrus kako bi se uklonila suvišna voda. U sljedećem koraku zrna su pomoću pincete složena u Petrijeve zdjelicu pri čemu je brazdica morala biti okrenuta prema dolje (slika 15).



Slika 15. Zrna okrenuta brazdicom prema dolje

Foto original: Leona Pavlic

Kada su sva zrna složena slijedilo je ulijevanje 2%-tnog fenola u Petrijeve zdjelice. Postupak pripreme otopine: 10 g fenola se odvaži i pomiješa s 1 l obične vode, u slučaju da se fenol ne otapa potrebno je bocu staviti u 30 minuta u toplu kupku. Rok tako napravljenog fenola je 10 dana. Pri pripravljanju otopine fenola potrebna je zaštitna oprema. Za tretiranje fenolom korištena je špric boca s uskim dugim nastavkom kojim je bilo omogućeno ujednačeno ulijevanje uz rub zdjelice, kako se zrna ne bi pomjerila ili dodirivala. Svaku Petrijevu zdjelicu je bilo potrebno poklopiti, kako ne bi fenol ishlapio, te ostaviti u digestoru 4h na temperaturi 18-20°C (slika 16). Zrna ne smiju biti na direktnoj svjetlosti. Nakon isteka 4h slijedilo je ocjenjivanje obojenosti zrna pšenice na skali od 0 do 9.



Slika 16. Genotipovi potopljeni fenolom

Foto original: Leona Pavlic

Tablica 2. Metoda fenolnog testa

1. BROJ ZRNA ZA TEST	<ul style="list-style-type: none"> • 100 zrna (2 ponavljanja); zrna ne bi smjela biti tretirana
2. PRIPREMA ZRNA	<ul style="list-style-type: none"> • 16-20 sati zrna upijaju vodu nakon stavljanja u Petrijeve zdjelice; uklanja se suvišna voda
3. KONCENTRACIJA OTOPINE	<ul style="list-style-type: none"> • 2% otopina fenola
4. KOLIČINA OTOPINE	<ul style="list-style-type: none"> • $\frac{3}{4}$ zrna treba biti prekriveno otopinom
5. MJESTO	<ul style="list-style-type: none"> • laboratorij
6. UVJETI SVIJETLA	<ul style="list-style-type: none"> • dnevna svjetlost
7. TEMPERATURA	<ul style="list-style-type: none"> • 18-20°C
8. VRIJEME U FENOLNOJ OTOPINI	<ul style="list-style-type: none"> • 4 sata
9. OCJENA	<ul style="list-style-type: none"> • skala od 0 do 9
10. BILJEŠKE	<ul style="list-style-type: none"> • čisto sjeme/nečistoće u sjemenu

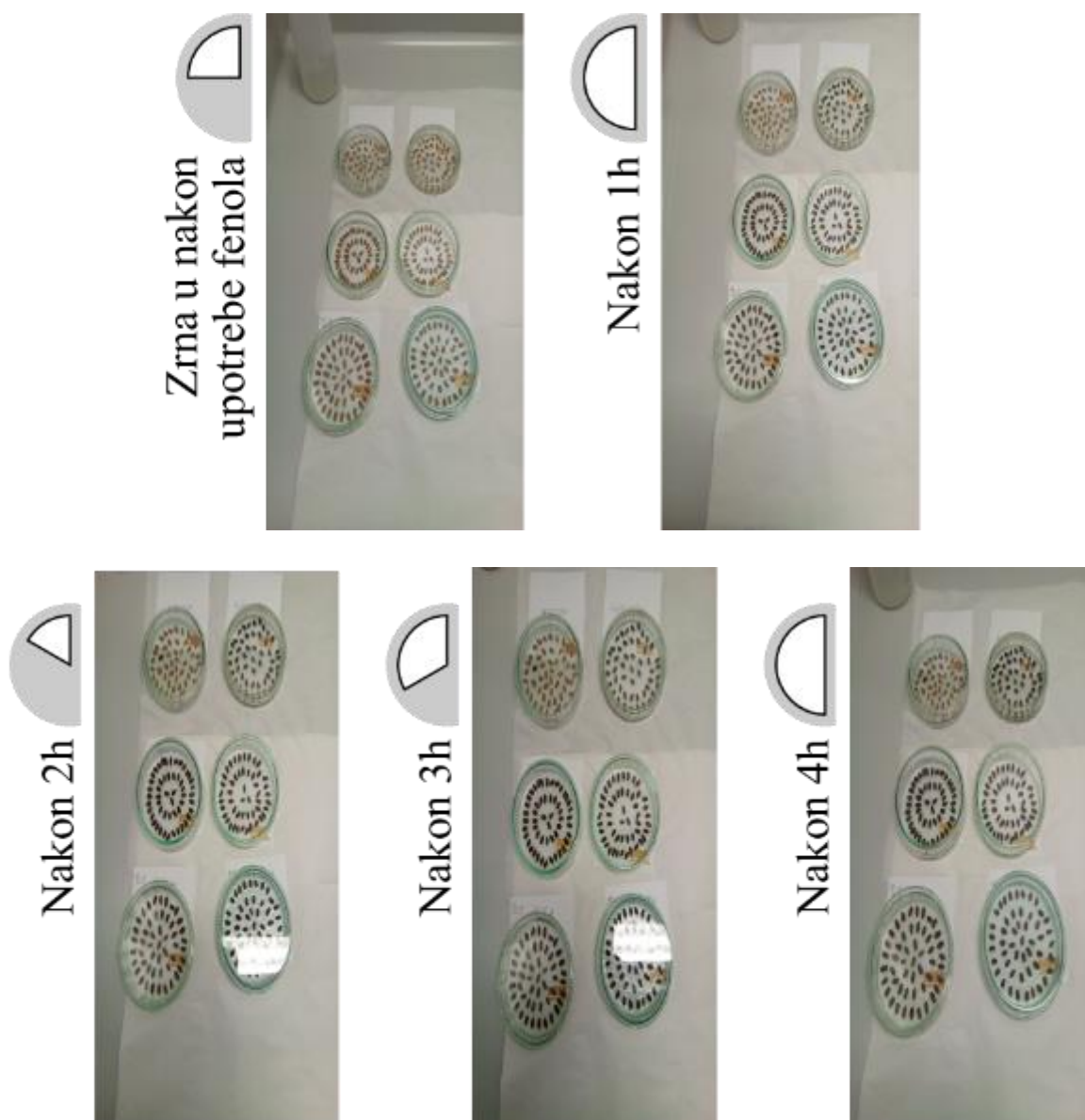
3. REZULTATI I RASPRAVA

Nakon provedbe fenolnog testa na 20 genotipa pšenice dobiveni su sljedeći rezultati prikazani u tablici 3. Ukupno osam genotipova je pokazivalo najjaču obojenost ocjenjenu s brojem 9, dva genotipa je ocjenjeno s 8, jedan genotip sa 7, po dva genotipa s ocjenom 6, 5 i 4, po jedan genotip s ocjenom 3, i 2 te jedan genotip je pokazivao najslabiju obojenost, ocjenjenu s 1. U niti jednoga genotipa nije bila zabilježena ocjena 0.

Tablica 3. Ocjene obojenosti genotipova

Ocjena obojenosti	Genotip
1	Isengrain
2	Gabi
3	Ema
4	Sana
4	Matea
5	Prima
5	<i>Triticum sphaerococcum</i>
6	Lucija
6	<i>Triticum compactum</i>
7	Fiesta
8	Perla
8	Mv Karizma
9	Renesansa
9	Ludwig
9	Cerera
9	Divana
9	Kalista
9	Bc Anica
9	Žitarka
9	U1

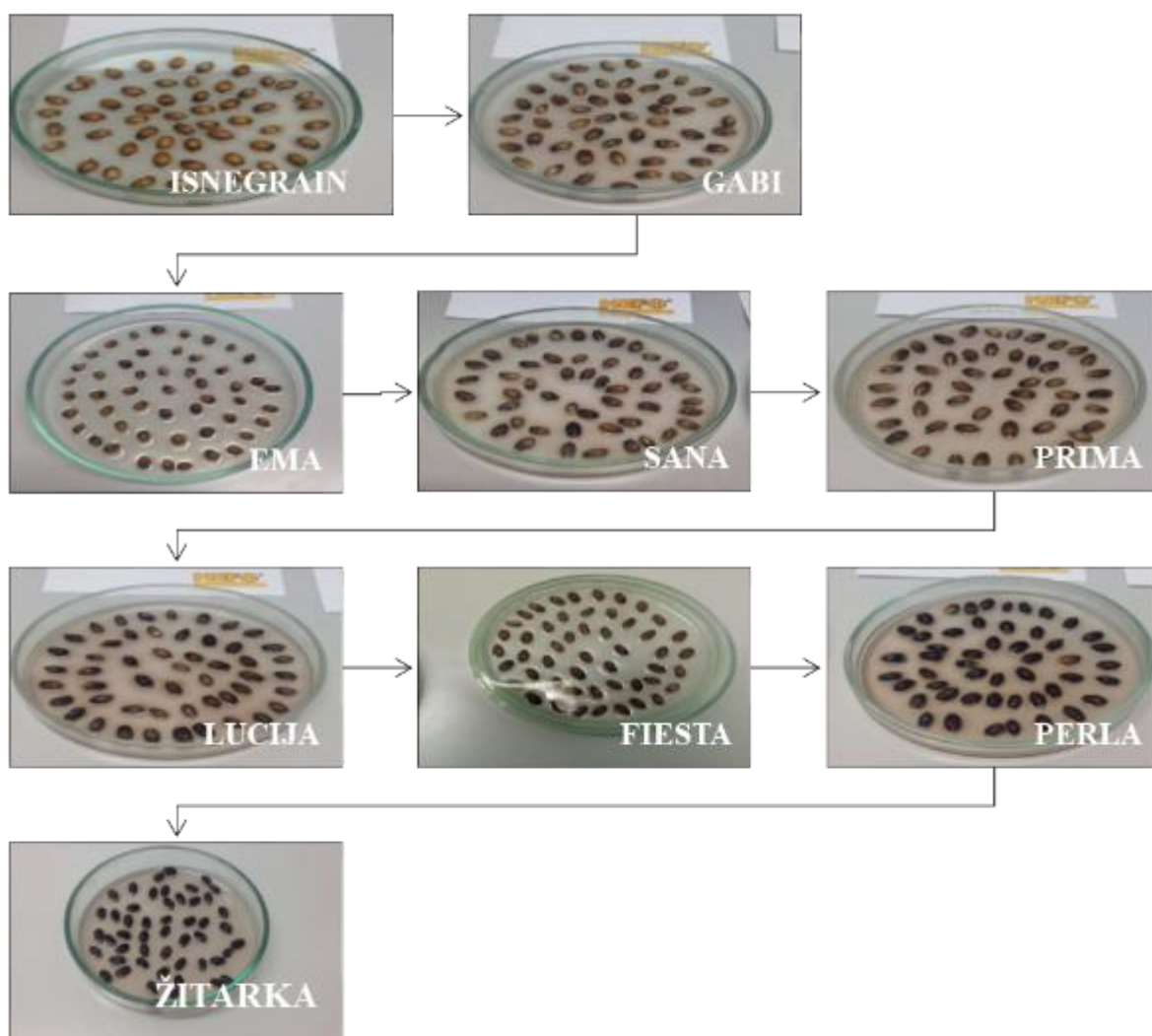
Svi genotipovi pokazivali su određeni stupanj obojenosti perikarpa sjemena. Obojenost perikarpa sjemena mogla se uočiti i prije isteka 4h, no točna obojenost je bila nakon 4h. Svaki sat obojenost je bila jače ili slabije izražena ovisno o jačini obojenosti koju je sjeme pokazivalo nakon 4 sata. Na slici 17. je prikazana promjena obojenosti kroz sate u genotipova: Matee, Kaliste, Renesanse, Divane, Bc Anica i Mv Karizme.



Slika 17. Promjena obojenosti kroz sate

Foto original: Leona Pavlic

Procjena ujednačenosti obojenja sjemena izračunala se tako da su prebrojana ona sjemena koju su odstupala od stupnja obojenosti većine sjemena po ispitivanom genotipu (slika 18). U pojedinim genotipova je ujednačenost obojenosti je varirala od jednog zrna (genotip Sana - 1% odstupanja (slika 19)) do odstupanja od 2% (dva zrna) u genotipa Perle (slika 20) što je u dozvoljenom rasponu procjene genetske čistoće (UPOV, 1996.). Sjeme svih genotipova je ocijenjeno kao genetski čisto.



Slika 18. Ujednačenost obojenosti devet genotipova pšenice

Foto original: Leona Pavlic



Slika 19. Odstupanje od 1% Sana

Foto original: Leona Pavlic



Slika 20. Odstupanje od 2% Perla

Foto original: Leona Pavlic

Slične rezultate istraživanja na pšenici je prikazao i El-Kalla (2010.). U istraživanju je koristio tri sorte pšenice: Sakha 94, Giza 168 i Gemmiza 10. Kako bi pokazao povezanost morfološkog i biokemijskog karaktera pri čemu je koristio mnoge testove, a jedna od njih je bio i fenolni test. Za fenolni test koristio je 1% otopinu fenola i prikazao obojenja ocjenjena nazivom : nema obojenja, slabo obojenje, vrlo svijetlo obojenje te tamno obojenje.

Mohamed (2011.) je proveo istraživanje na četiri sorte pšenice gdje je koristio od svake sorte 25 zrna te 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% te 1% otopinu fenola. Istraživali su obojenost sjemena te utjecaj hlapljenja fenola na intenzitet boje sjemena.

U svrhu sortne karakterizacije i analize čistoće sjemena pšenice Ukain i sur. (2016.) su . proveli istraživanje na 28 genotipova. Korišteni su mnogi kemijski testovi, a jedan od njih

bio i fenolni test s kojim su dobiveni sljedeći rezultati: u šest genotipova nije zabilježeno obojenje (ocjena 0), dok je ocjena svijetlo smeđe zabilježena u devet, a tamno smeđe u pet genotipova.

4. ZAKLJUČAK

Za ispitivanje genetske čistoće sjemena odabrano je 20 genotipova pšenice na kojima je te proveden fenolni test. Od ukupno 20 genotipova osam genotipova je pokazivalo najjaču obojenost ocjenjenu (ocjena 9), dva genotipa je ocijenjeno s ocjenom 8, jedan genotip sa 7, po dva genotipa s ocjenom 6, 5 i 4, po jedan genotip sa ocjenom 3, i 2 te jedan genotip je pokazivao najslabiju obojenost (1). U niti jednoga genotipa nije bila zabilježena ocjena 0. Ujednačenost obojenosti je varirala od jednog zrna (genotip Sana - 1% odstupanja) do odstupanja od 2% (dva zrna) u genotipa Perle. Sjeme svih genotipova u pokusu je ocijenjeno kao genetski čisto.

5. LITERATURA

1. Amić, D. (2008.): Organska kemija. Školska knjiga d.d., Osijek. 76-83.
2. El-Kalla, S.E., Lillah, A.A., El-Emery, M.I., Kishk, A.M.S. (2010): Determination of Genetic Purity in Three Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) Varieties. Research Journal of Seed Science, 3: 227-233.
3. Kolak, I. (1989): Kvaliteta i kontrola kvalitete sjemena. Stručni rad. Institut za oplemenjivanje i proizvodnju bilja, Zagreb.
4. Madjarić, Z. (1995): Suvremena proizvodnja pšenice. Grupa izdavača, Osijek. 14-41.
5. Mohamed, E.A.I. (2011): Laboratory methods for the recognition of seed of some wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties. J. Plant Production, Mansoura Univ., Vol. 2(1): 157-163.
6. Rapić, V. (2002): IUPAC: Vodič kroz IUPAC-ovu nomenklaturu organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb.
7. Rukavina I., Jurić, R., Varnica, I. (2009): Utvrđivanje fenotipske različitosti ozime pšenice u DUS ispitivanju. Zbornik radova 44. i 4. međunarodnog simpozija agronoma Opatija, Marić, S.; Lončarić, Z. (ur.). Osijek, 385-389.
8. Rukavina, I., Jurić, R., Varnica, I. (2008): DUS ispitivanja novih sorata ozime pšenice u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2000. do 2008. Zbornik radova 45. i 5. međunarodnog simpozija agronoma Opatija, Pospišil, M. (ur.) Zagreb, 269-272.
9. Stričević, D., Sever, B. (2014.): Temelji organske kemije. Profil International, Zagreb. 65-67.
10. Španić, V. (2016): Pšenica. Poljoprivredni institut Osijek, Osijek. 83-95.
11. Thangavel, P., Bharathi, A., Natarajan, N., Evera, T. (2005): Varietal Grouping in Sorghum by Seed and Seedling Morphology and Response to Chemical Testing. Karnataka J. Agric. Sci., 18 (3):664-672
12. Ukani, J.D., Patel, J.B., Babariya, C.A., Ramani, P.S. Characterization of Wheat Varieties (*Triticum* spp.) through Chemical Test. The Bioscan, 11(1): 315-319.
13. UPOV (1996): Guideline for the distinctness, uniformity and stability wheat (*Triticum aestivum* L.). TG/3/11.
14. Vijayalakshmi, B., Vijay, D. (2009): Development of Seed Keys for Variety Identification in Rice using Chemical Tests. Seed Research, Vol. 37(1/2): 56-61

15. PMF, Prirodoslovni – matematički fakultet, Mrežni udžbenik iz genetike

<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pojmovnik.htm>