



РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ
Министерство на земеделието и храните
Изпълнителна агенция по сортоизпитване, апробация и семеконтрол

ПРОВЕЖДАНЕ НА АНАЛИЗ ЗА КЪЛНЯЕМОСТ

(СОП 05)

2024

1. ОБХВАТ НА ПРИЛОЖЕНИЕ

Тази процедура се прилага от Изпълнителна агенция по сортоизпитване, апробация и семеконтрол (ИАСАС) за провеждане на анализ за кълняемост на проби от партиди семена за сертификация по Закона за посевния и посадъчния материал (ЗППМ), за издаване на ISTA оранжев международен сертификат и на проби, предоставени от клиента.

Процедурата се прилага в отдел „Централна лаборатория“ и в териториални лаборатории на ИАСАС, както и от лаборатории по чл. 7 от ЗППМ.

2. ОТГОВОРНОСТ

Отговорност за прилагането на процедурата има главния директор на Главна дирекция „Сортоизпитване, апробация и семеконтрол“ и началник на отдел „Централна лаборатория“.

3. СВЪРЗАНОСТ

- 3.1. Закон за посевния и посадъчния материал, обн. ДВ., бр. 20 от 4 март 2003 г.;
- 3.2. ISTA правила за тестване на семена;
- 3.3. ISTA наръчник за кълняемост;
- 3.4. ISTA акредитационен стандарт за тестване и пробовземане на семена.

4. ДЕФИНИЦИИ

4.1. Кълняемост

Кълняемост (при лабораторни условия) е покълването на семената и развитието на кълновете до етап, в който основните структури на кълна са достатъчно развити и може да се определи дали семето, при подходящи условия, е способно да се развие в пълноценно растение на полето.

4.2. Паралелен тест

Когато по едно и също време една и съща проба се анализира по повече от един от приетите методи и се документира най-добрият резултат.

4.3. Процент на кълняемост

Кълняемостта, записана в документа за лабораторен анализ /сертификата, показва броя на семената, класифицирани като нормално покълнали изразени в процент при условията и периода за анализ за кълняемост, посочени в Таблица 1, Приложение 1, изразен в процент.

4.4. Основни части на кълна

За развитието на кълновете в пълноценно растение, в зависимост от анализирания вид, са необходими специфични комбинации от следните основни структури:

- коренова система (първичен корен, в някои случаи вторични корени);
- главно стъбло на кълна (хипокотил; епикотил; при някои видове от *Roaseae* мезокотил; връхна пъпка);
- котиледони (един или няколко);
- колеоптил (при всички *Roaseae*).

4.5. Правило за 50%

Правилото за 50% се прилага за оценка на котиледоните и първичните листа.

4.6. Котиледони

Кълновете се класифицират като нормални, когато повече от половината тъкан на котиледоните е във видимо добро състояние.

Кълновете се класифицират като ненормални, когато повече от половината тъкан на котиледоните е липсваща, некротирала, обезцветена или с признаци на заболяване.

4.7. Първични листа

Задължително се прави оценка на първичните листа при видове като *Phaseolus*.

Кълновете се класифицират като нормални, когато повече от половината тъкан на първичните листа е във видимо добро състояние.

Кълновете се класифицират като ненормални, когато повече от половината тъкан на първичните листа е липсваща, некротирала, обезцветена или с признаци на заболяване.

Правилото за 50% не се прилага, ако има повреда и загиване на котиледоните в мястото на прикрепване към стъблото на кълна или връхната пъпка е некротирала или загнила, такива кълнове се класифицират като ненормални независимо от състоянието на котиледоните или първичните листа. Правилото за 50% не се прилага при кълнове, при които има повреда или загиване в мястото на прикрепване на единия котиледон към стъблото и другия котиледон не е напълно здрав. Такива кълнове също се класифицират като ненормални.

4.8. Нормални кълнове

Нормалните кълнове показват способност за развитие в пълноценни растения в почвата с подходящи условия – влага, температура и светлина. За да бъдат класифицирани като нормални, кълновете трябва да отговарят на една от следните три категории:

Нормалните кълнове, в зависимост от анализирания вид, показват специфична комбинация от следните структури:

4.8.1. Напълно развити кълнове: кълнове, чиито основни части са добре развити, здрави и с правилни пропорции:

а) добре развита коренова система, състояща се от:

– *първичен корен*, дълъг и тънък, обикновено покрит с известен брой коренови власинки и завършващ с фино връхче;

– *вторични корени*, когато са образувани в рамките на периода за анализ за кълняемост, посочен в Таблица 1 на Приложение 1;
– *няколко корена* (коренова брада), вместо един първичен корен при някои родове, вкл. *Avena, Hordeum, Secale, Triticum, x Triticosecale, Cyclamen*.

б) главно стебло, добре развито състоящо се от:

– *хипокотил*, прав, обикновено тънък и удължен при кълнове с епигейно покълване;
– *епикотил*, добре развит, при кълнове с хипогейно покълване;
– *хипокотил и епикотил* едновременно удължени, при някои родове с епигейно покълване;
– *мезокотил* удължен, в някои видове от *Poaceae*.

в) специфичен брой котиледони:

– *един* котиледон, при монокотиледонните или по изключение при дикотиледонните (може да бъде зелен и листоподобен или видоизменен и намиращ се изцяло или частично в семето);
– *два* котиледона, при дикотиледонните (при видове с епигейно покълване те са зелени и листоподобни, размерът и формата варира според вида на семето. При кълнове с хипогейно покълване котиледоните са полусферични и месести и остават в семенната обвивка).

г) първични листа, зелени, разтварящи се:

– *един* първичен лист, при кълнове с редуващи се листа или;
– *два* първични листа при кълнове със срещуположни листа.

д) връхна пъпка или връхна част на кълна, съдържаща растежния връх, чието развитие варира в зависимост от вида на семето.

е) колеоптил, добре развит, прав при *Poaceae*, съдържащ зелен лист, който достига връхчето и след това се показва над него.

4.8.2. Кълнове с леки дефекти: кълнове, които показват леки дефекти на основните си структури, при условие, че развитието им е задоволително и балансирано в сравнение с нормалните кълнове от същия анализ.

За леки се смятат следните дефекти, при които кълновете се класифицират като нормални:

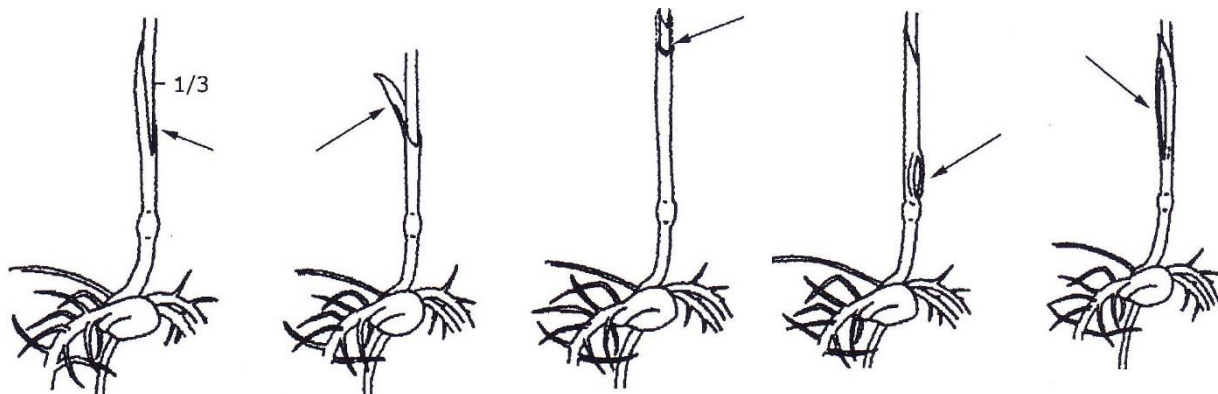
– *първичен корен* с повърхностно увреждане (например, не засягащо проводимата тъкан) или слабо забавяне на растежа (за *Spinacia oleracea*, дължината на първичния корен трябва да бъде равна или по-голяма от половината от дължината на хипокотила);
– *първичен корен* с дефект, но с достатъчно добре развити вторични корени при определени видове от *Fabaceae*, особено при едросеменни видове като *Phaseolus, Pisum* и *Vicia, Poaceae*, напр. *Zea*, всички видове на *Cucurbitaceae*, (напр. *Cucumis, Cucurbita, Citrullus*), *Malvaceae* (напр. *Gossyioium*).
– *най-малко три вторични корена*, всеки от които трябва да е по-голям или равен на половината от дължината на хипокотила, при *Glycine max* и *Helianthus annuus*, когато първичният корен е дефектен.

- само един добре развит вторичен корен при: *Avena*, *Hordeum*, *Secale*, *Triticum*,
x *Triticosecale*, два вторични корена при *Cyclamen*;
- хипокотил, епикотил или мезокотил с малки повреди, които не засягат
проводящата тъкан;
- котиледони с малки повреди (ако половината или повече от цялата тъкан
функционира нормално (правило на 50-те %) и ако не се забелязва увреждане или
загниване на растежния връх или тъканите около него);
- само един нормален котиледон при дикотиледонните (ако, не се забелязва
увреждане или загниване на растежния връх или тъканите около него);
- три котиледона вместо два (при условие, че се спазва правилото за 50-те %);
- сраснали котиледони (при условие, че се спазва правилото за 50-те %);
- първични листа с малки повреди (ако половината или повече от цялата тъкан
функционира нормално /правило за 50 %/);
- само един нормален първичен лист, например при *Phaseolus* (ако не се забелязва
увреждане или загниване на връхната пъпка);
- първични листа на *Phaseolus*, които са правилно оформени, но с по-малки
размери, но по-големи от $\frac{1}{4}$ от нормалната големина
- три първични листа вместо два, при *Phaseolus* (при условие, че съответстват на
правило за 50-те %);
- колеоптил с малки повреди;
- колеоптил разцепен от върха до не повече от $\frac{1}{3}$ от дължината (при *Zea mays*,
кълновете с дефекти в колеоптила, показани на Фигура 1а могат да бъдат класифицирани
като нормални ако първия лист е незасегнат (цял) или слабо увреден както е показано на
Фигура 1б);
- колеоптил усукан или формиращ примка (защото е задържан под лемата и
палеата или в семенната обвивка);
- колеоптил със зелен лист, който не достига до върха, но е поне до средата на
колеоптила.

4.8.3. Оценка на кълнове при царевица с дефекти на колеоптила

Фигура 1а

Оценка на кълнове при царевица с дефекти на колеоптила. Кълновете са нормални, ако първичният лист е цял или с лека повреда, както е показано на Фигура 1б. Кълновете са ненормални, ако първичният лист е повреден, както е показано на Фигура 1б



Разцепен повече от 1/3

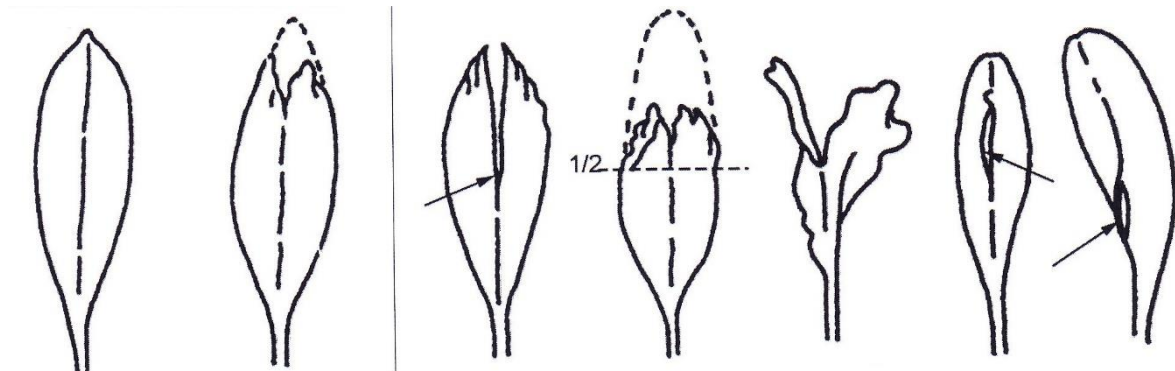
Превит колеоптил

Липсващ връх

Разцепен в основата

Разцепен от гръбната страна

Фигура 1б
Оценка на кълнове при царевица с дефекти на колеоптила



Нормален лист Слабо повреден Повреден Повреден Повреден Повреден Повреден

← Кълнове с дефекти от Фиг. 1а класифицирани като нормални кълнове | Кълнове с дефекти от Фиг. 1а класифицирани като ненормални кълнове →

4.8.4. Кълнове с вторична инфекция:

Кълнове, които са засегнати сериозно от гъбни или бактериални болести се класифицират като нормални, ако е очевидно че семето не е източник на инфекцията и може да се види наличие на всички основни структури на кълна.

4.8.4.1. Ненормални кълнове

Ненормално покълналите семена не показват потенциал да се развият в нормално растение когато се отглеждат при подходящи условия: почва, влага, температура и светлина.

Като ненормални се класифицират следните кълнове:

а) увредени: кълнове, при които някои основни структури липсват или са толкова увредени, че не може да се очаква балансирано развитие.

б) деформирани или небалансирани: кълнове, които са слабо развити, с физиологични нарушения или при които основните части са деформирани или несъразмерни.

в) загнили кълнове: кълнове, на които някоя от основните части е засегната от гъбни или бактериални болести или е загнила в резултат на първична инфекция (т.е. семето е източник на инфекцията), която изключва нормално развитие.

Един или комбинация от следните дефекти, определя кълна като **ненормален**:

4.8.4.2. Общи ненормалности

00 Кълнът е:

00/01 Деформиран

00/02 Счупен

00/03 Котиледоните са се показали от обвивката без да има първичен корен

00/04	Съдържа два сраснали се кълна
00/05	Има „якичка“ от ендосперм
00/06	Бял или жълт на цвят
00/07	Усукан
00/08	Стъкловиден
00/09	Загнил, поради първична инфекция
00/10	Със симптоми на фитотоксичност
00/11	Небалансиран
00/12	При <i>Poaeseae</i> , с отделен ендосперм

4.8.4.3. Ненормалности на кореновата система

11. Първичният корен е:

11/01	Недоразвит
11/02	Къс и удебелен
11/03	Изостанал в развитието си
11/04	Липсващ
11/05	С дълбока пукнатина или е счупен
11/06	Разцепен от върха или по цялата дължина
11/07	Задържан в семенната обвивка
11/08	С отрицателен геотропизъм
11/09	Свит
11/10	Усукан
11/11	Стъкловиден
11/12	Загнил, поради първична инфекция

Забележка: Вторични корени, показващи един или няколко от горните дефекти също са ненормални и не могат да заместят един ненормален първичен корен, в случаите когато наличието на няколко вторични корена (например при *Cuscutis*) са важни за правилната оценка на кълна.

12. Вторични корени:

12/01	Недоразвити
12/02	Къси, удебелени
12/03	Със забавено развитие
12/04	Липсващи
12/05	С отрицателен геотропизъм
12/06	Стъкловидни
12/07	Загнили, поради първична инфекция

Забележка: За да се класифицира кълнът като нормален се изисква наличието поне на един силен вторичен корен (например при *Triticum*) или на два силни вторични корена (например при *Cyclamen*).

4.8.4.4. Ненормалности на кълна

21. Хипокотилът, епикотилът или мезокотилът е:

21/01	Къс и/или дебел (с изключение на <i>Cyclamen</i>)
21/02	Не образува грудка (само при <i>Cyclamen</i>)
21/03	С дълбока пукнатина или е счупен
21/04	Разцепен по цялата дължина
21/05	Липсващ

- 21/06 Силно извит или образувал примка
- 21/07 Образува спирала
- 21/08 Силно усукан
- 21/09 Свит
- 21/10 Усукан
- 21/11 Стъкловиден
- 21/12 Загнил, в резултат на първична инфекция
- 21/13 Показва отрицателен фототропизъм

22. Връхната пъпка и заобикалящите я тъкани са:

- 22/01 Деформирани
- 22/02 Повредени
- 22/03 Липсват
- 22/04 Некротирани
- 22/05 Загнили, в резултат на първична инфекция

Забележка: Кълнът се класифицира като ненормален, ако връхната пъпка не се развива нормално (например при *Phaseolus* и *Pisum*).

4.8.4.5. Ненормалности на котиледоните и първичните листа

31. Котиледоните (прилага се правилото на 50-те %) са:

- 31/01 Набъбнали или накъдрени
- 31/02 Деформирани
- 31/03 Счупени или увредени по друг начин
- 31/04 Разделени или липсващи
- 31/05 Обезцветени или некротирани
- 31/06 Прозрачни
- 31/07 Загнили, в резултат на първична инфекция
- 31/08 Сраснали от двете страни

Забележка: Повреда и загиване на котиледоните в мястото на прикрепване към главното стъбло на кълна или в близост до връхната пъпка определя кълна като ненормален, независимо от правилото за 50%.

Правилото за 50% не се прилага и ако един котиледон е некротирал или загнил в точката на прикрепване към главното стъбло, а другият котиледон не е цял и добре радвит, такъв кълн също се класифицира като ненормален.

32. Специални дефекти на котиледона при *Allium spp.*:

- 32/01 Къс и дебел
- 32/02 Силно извит или образувал примка
- 32/03 Образува спирала
- 32/04 Без оформено „коляно“
- 32/05 Свит
- 32/06 Усукан
- 32/07 Загнил в резултат на първична инфекция

33. Първичните листа (прилага се правилото на 50-те %) са:

- 33/01 Деформирани
- 33/02 Повредени

- 33/03 Липсващи
- 33/04 Обезцветени
- 33/05 Некротирани
- 33/06 С нормална форма, но с размер по-малък от $\frac{1}{4}$ от нормалния размер (само при *Phaseolus*)
- 33/07 Загнили, в резултат на първична инфекция

4.8.4.6. Ненормалности на колеоптила и първичните листа

41. Колеоптилът е:

- 41/01 Къс и дебел или деформиран по друг начин
- 41/02 Счупен
- 41/03 Липсващ
- 41/04 Има дефект или е без връх
- 41/05 Силно извит или образува примка
- 41/06 Образува спирала
- 41/07 Силно усукан
- 41/08 Разцепен от върха повече от една трета от дължината
- 41/09 Усукан
- 41/10 Загнил, в резултат на първична инфекция
- 41/11 Разцепен в основата си
- 41/12 Задържан под лемата (плевата) или семенната обвивка

Забележка: Кълн, на който колеоптила е задържан под лемата или семенната обвивка се класифицира като нормален, ако се развива нормално. Ако растежът е спрял, трябва да се определи като ненормален.

Забележка: Само при *Zea mays*: кълнът се класифицира като ненормален, когато колеоптилът има един от следните дефекти заедно с повредите на първичния лист, които са показани на Фигура 1а.

Ако при отчитането **е налице първичен лист:**

- а) колеоптилът е разцепен от върха повече от $\frac{1}{3}$ от дължината;
- б) колеоптилът е силно завит;
- в) колеоптилът е повреден или липсва;
- г) колеоптилът е разцепен на което и да е място под върха;

Ако при отчитането **не е налице първичния лист:**

- а) върхът на колеоптила е повреден или липсва,
 - б) колеоптилът е разцепен от върха повече от $\frac{1}{3}$ от дължината;
 - в) лист, който се е подал изпъкнал под върха на колеоптила.
42. Първичният лист е:

- 42/01 С дължина по-малка от половината от дължината на колеоптила
- 42/02 Липсва
- 42/03 Разкъсан (не е цял) или деформиран по друг начин
- 42/04 Се е подал под върха на колеоптила
- 42/05 Бял или жълт (липсва хлорофил)
- 42/06 Загнил, в резултат на първична инфекция

4.9. Многокълнови семенни единици (МСЕ)

Семена, които са способни да продуцират повече от един кълн са МСЕ.

Няколко вида семена могат да покълват с повече от един кълн:

– такива, които съдържат повече от едно истинско семе (например множество семенни единици при *Dactylis*, *Festuca*, *x Festulolium* и *Lolium*, неразделени шизокарпи (сухи плодове с повече от едно семе) на *Apiaceae*, съплодия на *Beta vulgaris*, плодове на *Tectona grandis*);

– семе, съдържащо повече от един зародиш.

Нормално това може да възникне при някои видове (поли ембриони) или по изключение при някои видове (близнаци). В този случай един от кълновете е слаб или вретеновиден, но понякога и двата са с нормален размер;

– сраснали кълнове.

Понякога едно семе покълва с два кълна, които са сраснали.

За да се класифицира МСЕ като нормално покълнала е достатъчен един нормален кълн. Ако МСЕ има повече от един нормален кълн, за да се определи процента кълняемост се отчита само един кълн.

По искане на заявителя може да бъде отчетен броя или пропорцията на нормалните кълнове получени от 100 МСЕ или тези с два или повече нормални кълна.

4.10. Непокълнали семена

Семена, непокълнали до края на периода за анализ при условията, дадени в Таблица 1 и се класифицират по следния начин:

а) твърди семена: семена, които остават твърди до края на анализа, тъй като не са абсорбирали вода.

Това е форма на латентност (състояние на покой). Често се среща при много видове от *Fabaceae*, но може да се появи и при други видове. Тези семена не могат да поемат вода при условията, посочени в Таблица 1 и остават твърди.

б) свежи семена: семена, различни от твърдите, които не са успели да покълнат при условията за кълняемост, дадени в Таблица 1, поради латентност (състояние на покой), но остават чисти и здрави и имат потенциал да развият нормален кълн.

Способни са да поемат вода при условията за анализ посочени в Таблица 1, но процеса на покълване е блокиран.

в) мъртви семена: семена, които в края на анализа за кълняемост не са нито твърди, нито свежи, нито са образували част от кълна.

Мъртвите семена абсорбират вода, обикновено са меки, обезцветени, често мухлясали и не показват никакви признаци за развитие на кълн.

г) други категории: непокълналите семена могат да бъдат допълнително определени както:

- празни семена (напълно празни или съдържащи остатъчна тъкан),
- семена без зародиш (съдържат свеж ендосперм или гаметофитна тъкан, в която няма нито ембрионална кухина, нито зародиш),
- семена, повредени от насекоми (съдържат ларви или имат други белези от нападение на насекоми, което доказва неспособността на семената да покълват).

Описаните по-горе категории могат да възникнат при всеки вид семена, но по-често се срещат при дървесните видове.

5. ПРИЛОЖИМИ ДОКУМЕНТИ

Работна бланка за анализ на кълняемост (от Интегрираната система за анализ на семена в ИАСАС (ИСАС))

СОП 04 „Провеждане на анализ чистота и определяне на семената от други растения в лабораторията“

Ф 5.1 Дневник за работа на термостат

6. ОБЩИ ИЗИСКВАНИЯ

Тестът за кълняемост се провежда със семена от фракцията на чистото семе.

Прилагат се дефинициите за чисто семе за съответния вид. Чистото семе може да бъде взето или от фракцията на чистото семе, получена при анализа за чистота (както е посочено в СОП 04. „Провеждане на анализ чистота и определяне на семената от други растения в лабораторията“), или от представителна фракция от средната проба. Когато партида е била дражирана се използва дефиницията за чисти дражета с изключение на случаите на семена в ленти или килимчета, които се анализират за кълняемост заедно с материала, в който са поставени.

При необходимост може да се извърши паралелен или дублиращ анализ. Правилата за съобщаване на резултатите са описани по-нататък. Ако са предприети допълнителни тестове след каквото и да било предварително третиране, резултатът и третирането трябва да се отбележат под „други изследвания“ в документа за лабораторен анализ и в сертификата.

Семената се разпределят в повторения и се поставят при подходящи условия за кълняемост, посочени в Приложение 1 „Методи за кълняемост“. След определения период в Приложение 1 се извършва анализа като се преброяват нормално покълналите семена и семената от различните категории ненормално покълнали.

6.1. Апарати и материали

6.1.1. Съдове за провеждане на анализа

Съдовете за провеждане на анализа могат да бъдат пластмасови, стъклени или керамични съдове, при условие, че нямат токсичен ефект и са чисти от микроорганизми.

6.1.2. Приспособления за отброяване на семената

За по-едрите, семена като *Zea*, *Phaseolus*, *Pisum* и др. обикновено се използват маркирани плоскости с приблизителния размер на субстрата. С помощта на маркерите се постига равномерно разпределение на семената в субстрата.

6.1.3. Апарати за покълване

Термостат и термостатна стая

Представлява затворен шкаф със или без осветление и възможност за контрол и промяна на температурата в него, който се използва за провеждане на анализ кълняемост или за предварително третиране за преустановяване на покоя на семената. Термостатната стая е модификация на термостата, с по-голям размер, позволяващ анализаторите да се движат свободно в нея. Термостатите са добре изолирани и обикновено са с функция за загряване, както и за охлаждане. Температурата трябва да е равномерна в целия апарат и да е сигурно, че пробите са в предвидения температурен режим (± 2 °C). Ако апаратът не може да променя температурата, то в този случай могат да се използват два различни термостата с различни температури и пробите да се преместват от единия в другия. По време на анализа използваният субстрат трябва да бъде с оптимална влажност за покълване на семената до края на периода, посочен в Приложение 1. Някои апарати могат да подържат предварително зададен режим на относителна влажност и в тях анализите могат да се провеждат в отворени съдове, за разлика от другите апарати, в

които анализите се провеждат задължително в затворени съдове, за да не се променя влажността на субстрата.

Записи за промени в поддържащия режим на термостата се отразяват от анализатор във Ф 5.1 „Дневник за работа на термостат“.

6.2. Процедура

6.2.1. Лабораторна проба

Вземат се произволно четиристотин семена (четири повторения по 100 семена) от добре размесеното чисто семе и се поставят на еднакво разстояние едно от друго върху влажния субстрат. Повторенията могат да се разделят на по-малки повторения от по 50 или 25 семена в зависимост от размера на семената и необходимото разстояние между тях и ако има съмнение за патогени, пренасяни със семето. Когато анализът се провежда на филтърна хартия и семената са силно заразени от патогени или сапрофити може след първото отчитане останалите семена да се преместят на нова филтърна хартия.

Многокълновите семенни единици с изключение на *Arachis* не се разделят при анализа за кълняемост, а се разглеждат като единични семена.

Дефиницията за чисто семе при фъстъците (*Arachis*) е черупчест плод. Въпреки това, черупката се отстранява и в анализа за кълняемост участват само семената.

Лабораторният анализ за кълняемост за издаване на ISTA оранжев международен партиден сертификат, за сертификация по реда на ЗППМ и на проби, предоставени от клиенти се провежда върху 400 семена от фракцията на чистото семе, разделени в четири повторения по 100 семена.

По изключение, за издаването на ISTA оранжев международен партиден сертификат, анализът може да се проведе върху 100 семена, разделени в повторения от по 50 или 25 семена.

6.2.2. Загуба или добавяне на семена по време на анализ за кълняемост

Ако по време на анализа са загубени или в анализа са попаднали допълнително повече от 5 семена: $\pm 1,25$ % от общо 400, анализът трябва да бъде повторен.

Ако по време на анализа са загубени или прибавени до 5 семена всяко от повторенията се изчислява до 100 по следния начин: В едно от повторенията има 80 нормално покълнали, 10 ненормално покълнали и 9 мъртви семена и едно семе липсва. Прави се следното изчисление: $80 \times 100 / 99$ за нормалните, $10 \times 100 / 99$ за ненормалните и $9 \times 100 / 99$ за мъртвите. Закръгленията се правят така, както е описано в тази процедура.

Ако изпратената за анализ проба е с по-малка маса се уведомява пробовземача и анализът се спира до получаване на нова цяла проба.

В случай на много скъпи семена за издаване на ISTA оранжев международен партиден сертификат, анализът за кълняемост може да се проведе и върху по-малък от 400 брой семена. В този случай на сертификата се записва: „Представената проба тежи само ... g и не е в съответствие с Международните правила за тестване на семена“ (*The sample submitted weighed only ... g and is not in accordance with the International Rules for Seed Testing*).

6.3. Условия за анализ

Субстратът, температурата, времетраенето и допълнителните указания за третиране на семената в покой и групата за оценка на кълновете са посочени в Таблица 1 на Приложение 1 „Методи за кълняемост“ на настоящата процедура и за анализ

кълняемост не могат да се използват други освен описаните. Допълнителни насоки са достъпни и в Наръчника на ISTA за оценка на кълновете.

6.3.1. Субстрат филтърна хартия

ТР – на повърхността на филтърна хартия.

Семената покълват на повърхността на пласт/пластове филтърна хартия, в прозрачни кутии с капак. Кутиите се поставят в термостат.

Хартията се намокря с предварително изчислено количество вода в началото на анализа. За да се намали вероятността от изсушаване, съдовете за кълнене се поставят в термостата със затворени капаци или в затворени полиетиленови пликкове.

ВР – между два пласта филтърна хартия.

Семената покълват между два пласта филтърна хартия, което се постига посредством:

– поставяне на семената върху един пласт филтърна хартия и свободно покриване с още един пласт филтърна хартия в кутии с капак. Кутиите се поставят в термостат или в термостатна стая;

– поставяне на семената между два пласта филтърна хартия, които се завиват на ролка. Ролките се поставят в полиетиленови пликкове в изправено положение в термостат или в термостатна стая.

РР – в плисирана филтърна хартия.

Семената се поставят в плисирана филтърна хартия, обикновено по две семена в плисе. Семената се нареждат шахматно в плисетата за да има по-добро разпределение. Плисетата със семената се поставят в затворени кутии.

Методите ТР или ВР могат да се заменят с РР.

6.3.2. Субстрат пясък или органична среда

Пясък или органична среда се използват по следния начин:

ТС – на повърхността на пясък,

ТО – на повърхността на органична среда.

Семената се поставят на повърхността на описаните субстрати и леко се притискат.

S – в пясък,

O – в органична среда.

Семената се поставят на повърхността на навлажнен пласт от субстрата и се покриват с 10-20 mm слой от същия субстрат без да се притискат.

Пясък или органичен субстрат могат да се използват като алтернативен метод, дори без да е посочено в таблица за методите когато:

- семената показват висока степен на заразеност с гъбни болести и не може да се извърши правилна оценка на кълновете;
- трябва да се потвърди оценката на кълновете, ако е имало някакви съмнения;
- кълновете показват симптоми на фитотоксичност в друг субстрат.

6.3.3. Субстрат почва

Почвата не се препоръчва като субстрат. По принцип може да се използва като алтернатива на органичната среда, когато кълновете показват симптоми на фитотоксичност в субстрат хартия или пясък. Ако се използва почва за субстрат, тя трябва да отговаря на спецификацията.

6.3.4. Влага и аерация

По време на анализа за кълняемост, на семената трябва да бъде осигурена постоянна влажност. Допълнително намокряне трябва да се избягва защото то може да води до вероятност за увеличаване на варирането между отделните повторения или между анализите. Когато все пак се налага допълнително намокряне, то се прави по време на междинното отчитане.

Специални мерки по отношение на аерацията на семената при **ТР** и **РР** не са необходими, когато се използват затворени кутии. При **ВР** ролките не трябва да са навити много стегнато, за да се осигури достатъчно въздух около семената. По същата причина при използване на субстрат пясък или органична среда не се притиска повърхностния слой.

6.3.5. Температура

Температурите, предписани в Таблица 1, Приложение 1 за покълване или за периода на предварително охлаждане на даден вид, са тези, на които семената са изложени върху или вътре в субстрата.

Температурата трябва да се поддържа постоянна по време на анализа, независимо дали се провежда на тъмно или при изкуствена светлина, отклонението от предписаната температура не трябва да бъде повече от ± 2 °C.

Когато е предписан режим с променлива температура, ниската температура трябва да се поддържа за 16 часа, а високата за 8 часа. Преходът от едната към другата температура трябва да е плавен и в рамките на 3 часа. Когато е необходимо да се наруши покоят на семената може да се използва рязък преход в рамките на 1 час или семената директно да се преместят в друг термостат с предписаната температура.

Когато в таблицата за температурите е предписан интервал, например охлаждане от 5 до 10 °C не се прилагат толеранси нито за ниската, нито за високата температура. Това означава, че допустимият температурен интервал е от 5 до 10 °C, а не 5 ± 2 °C до 10 ± 2 °C.

6.3.6. Светлина

Семената от повечето видове в Таблица 1, Приложение 1 могат да покълват както на светлина, така и на тъмно. Използването на светлина се препоръчва, за да се постигне по-добро развитие на кълновете. Кълновете, покълнали при пълна липса на светлина са етиолирали, бели и по-чувствителни към микроорганизми. Освен това не може да бъде открита липсата на хлорофил, като дефект на кълновете.

В определени случаи (например при някои тропични и субтропични треви), светлината може да помогне за покълването на семена във физиологичен покой.

Светлината трябва да се генерира от лампи или LED еквиваленти между 3000 К (неутрално бяло) до 4000 К (студено бяло).

При някои видове (например *Phacelia tanacetifolia*), които трябва да покълват на тъмно, светлината затруднява процеса на покълване. Специфични препоръки за светлина или тъмнина са дадени в последната колона на Таблица 1.

6.4. Избор на метод

Когато в Таблица 1, Приложение 1 са предписани няколко метода, може да се използва всеки един от тях (възможна е всяка комбинация от субстрат и температура). Предпочитаният метод е маркиран.

Групата за оценка на кълновете е посочена в Приложение 1.

6.5. Времетраене на анализа

Времетраенето на анализа за отделните видове е посочено в Таблица 1.

Периодът, необходим, за прекъсване на физиологичния покой преди или по време на анализа не се включва в периода за анализ за кълняемост.

Ако в края на анализа е видимо, че някои семена едва са започнали да кълнят, посоченият период за кълняемост може да се удължи:

- със 7 дни, за видове с предписан период за кълняемост, равен или по-малък от 14 дни;
- с до половината от времето на целия анализ, за видове с предписан период за крайно отчитане по-голям от 14 дни;
- до 21 дена за *Lolium spp.*;
- до 32 дена за *Festuca spp.* (с изключение на *F. arundinacea* и *F. pratensis*);
- до 42 дена за *Poa spp.* (с изключение на *P. bulbosa*);
- до 54 дена за *Poa bulbosa*.

Ако максималната кълняемост е постигната преди края на посочения период за кълняемост, анализът може да бъде прекратен.

По искане на заявителя анализът за кълняемост може да бъде прекратен когато пробата достигне предварително определен процент кълняемост.

Времето на първото отчитане е приблизително, но трябва да бъде достатъчно, за да позволи на кълновете да достигнат етап на развитие, което дава възможност за точна оценка. Времето за отчитане посочено в Таблица 1 се отнася за по-високата температура.

Ако е избрана по-ниска температура, първото отчитане може да бъде отложено. За анализи в субстрат пясък или органична среда с продължителност не повече от 14 дни, първото отчитане може да бъде пропуснато.

Междинни отчитания на добре развитите кълнове е добре да се правят с цел по-лесно броене и даване на повече пространство на останалите семена за покълване.

Броят и датите на междинните отчитания са по преценка на анализатора, но все пак техният брой трябва да се поддържа минимален за да се намали риска от повреда на кълновете, които не са достатъчно развити. Когато анализът се провежда на субстрат филтърна хартия и непокълналите семена и кълновете, които изискват по-дълъг период за развитие до достигане на етап от развитието им, който позволява да се извърши правилна оценка, те могат да се прехвърлят на нов субстрат непосредствено след междинното отчитане. Прехвърлянето трябва да се извърши внимателно, за да се избегне повреждане на семената и кълновете.

Ако периодът на анализ за кълняемост приключва в почивен ден, окончателното отчитане може да се извърши в деня преди или след тази дата.

6.6. Оценка на кълновете

Всеки кълн трябва да се оцени в съответствие с основните дефиниции в настоящата процедура. Преди да се извърши оценка на кълновете по никакъв начин не трябва да се нарушава целостта на основните структури на кълна. Основните структури на кълна трябва да са достатъчно развити, за да може да се открие наличие на аномалии. В края на периода за кълняемост непокълналите семена могат да бъдат класифицирани както е описано по-долу.

6.6.1. Кълнове

Кълновете, които са развити до степен, в която всички основни структури могат да бъдат оценени, могат да бъдат отделени при първото или при последващи отчитания (ако има такива). Силно заболели или загнили кълнове също се отстраняват с цел намаляване на риска от заразяване на останалите семена, но ненормално покълналите могат да останат до края на теста, освен ако е очевидно, че те няма да се развият до нормални кълнове, например счупени, безцветни и др.

6.6.2. Многокълнови семенни единици

Когато една многосеменна единица произвежда повече от един нормален кълн, само един се брой за определяне на процента кълняемост.

При поискване на заявителя, броят на нормалните кълнове от 100 многокълнови семенни единици или броя многокълнови семенни единици, които имат един, два или повече от два нормално развити кълна, или пропорцията на единиците, произвеждащи една, две или повече от два нормални кълна, също може да бъде определена.

6.6.3. Непокълнали семена

а) твърди семена

В края на анализа за кълняемост твърдите семена (които не са поели влага по време на анализа) се преброяват и записват в работната бланка, документа от лабораторен анализ и сертификата на съответното място.

б) свежи семена

Когато в края на анализа за кълняемост са останали 5% или повече свежи непокълнали семена трябва да се приложи метод за определяне на потенциала им за покълване чрез срязване на семенната обвивка или поставяне в тетразолов разтвор.

Може да се използва тетразолов разтвор за определяне на потенциала за покълване на всички видове, изброени в Приложение 1 Методи за кълняемост.

Семената, които имат потенциал за покълване се определят като свежи, а тези които нямат потенциал за покълване се определят като мъртви. Ако има някакво съмнение дали семената са свежи или мъртви, те трябва да бъдат класифицирани като мъртви

Когато е необходимо да се извърши повторен анализ за кълняемост в лабораторията или по искане на заявителя, повторното анализиране с помощта на процедура за премахване на физиологичния покой, описана в Приложение 3, е от съществено значение.

в) мъртви семена

Мъртвите семена обикновено са меки, обезцветени, често мухлясали и не показват никакви признаци за развитие на кълн, преброяват се и се записват в работната бланка, документа от лабораторен анализ и сертификата на съответното място. Ако семето е образувало част от кълна (например върхът на първичния корен), въпреки това, че е загнил по време на оценката се класифицира като ненормално покълнало, а не като мъртво.

6.7. Повторен анализ за кълняемост

Повторен анализ за кълняемост може да се направи, ако:

а) се предполага латентност (състояние на физиологичен покой) на семената. Трябва да се използва метод за прекъсване на физиологичния покой от посочените в Приложение 3 при един или повече допълнителни анализи за кълняемост. На сертификата са записва най-добрия резултат и се посочва използвания метод;

б) резултатът от анализа не е достатъчно надежден поради фитотоксичност или има вторична инфекция, причинена от гъби или бактерии. В този случай трябва да се направят повторни анализи с алтернативни методи, както е посочено в Таблица 1 като се използва субстрат пясък или органична среда. Разстоянието между семената може да бъде увеличено, ако е необходимо. На сертификата са записва най-добрия резултат и се посочва използвания метод;

в) е трудно да се направи оценка на някои кълнове трябва да се направят повторни анализи с алтернативни методи както е посочено в Таблица 1, като се използва субстрат пясък или органична среда. На сертификата са записва най-добрия резултат и се посочва използвания метод;

г) очевидно е допусната грешка при условията на анализа, оценката и преброяването на кълновете трябва да се направи повторен анализ при същите или други условия, както е посочено в Таблица 1. На сертификата трябва да бъде записан резултатът от повторния анализ;

д) пробата не реагира задоволително на избрания метод за кълняемост е необходимо да се направят повторни анализи по един или повече алтернативни методи. Когато е трудно кълновете да бъдат оценени правилно или показват симптоми на фитотоксичност трябва да се направи повторен анализ в субстрат пясък или органична среда при температура, предписана в Таблица 1, Приложение 1. Може да се направи и паралелен анализ на проба от същия вид, за която е известно, че е с добра кълняемост. На сертификата се записва най-добрия резултат и се посочва използвания метод;

е) когато разликите в повторенията са извън предвидените толеранси в Таблица 2 трябва да се направи повторен анализ, проведен при същия или алтернативен метод. Ако резултатите от повторния анализ при използване на същия метод са съвместими с първия и повторенията са в предвидените толеранси на сертификата трябва да бъде записан осреднения резултат. Ако повторният анализ е извършен при алтернативен метод, резултатът е по-добър и повторенията са в предвидените толеранси на сертификата трябва да бъде записан резултатът от повторния анализ;

Когато се извършва повторен анализ при дадените обстоятелства в точка а., б., в. или д., на сертификата трябва да бъде записан най-добрия постигнат резултат. Резултатите от другите тестове не трябва да се записват в сертификата, освен при искане от заявителя.

ж) при анализа е допусната грешка при отчитането и са загубени или добавени повече от 5 семена ($\pm 1,25\%$ от 400 семена) анализът трябва да се повтори.

6.8. Изчисляване на резултатите

Резултатите от анализа се изразяват в процент по брой на нормални и ненормални кълнове, твърди, свежи и мъртви семена. Процентите се закръгляват до най-близкото цяло число. Сумата от процентите на нормално покълналите, ненормално покълналите, твърдите, свежите и мъртвите семена трябва да е 100.

За многокълновите семенни единици само един нормален кълн на единица се брой, за да се изчисли резултатът от анализа за кълняемост. По искане на заявителя броят на нормалните кълнове от 100 многосеменни единици, броят на многосеменните единици, покълнали с един, два или повече кълнове също може да бъде записан в процент.

6.8.1. Процедура на закръгляване

Първо се закръглява процента на нормално покълналите семена до най-близкото цяло число (например: XX.00 и XX.25 се закръгляват до XX, а XX.50 и XX.75 се

закръгляват до $XX+1$). Към процента на нормално покълналите се добавят процентите, закръглени до най-близкото цяло число на ненормално покълналите, твърдите, свежите и мъртвите семена. Ако сумата е 100, процедурата на закръгляване приключва.

В противен случай трябва да се продължи със следните стъпки:

а) намира се стойността с най-голямата десетична част от останалите проценти (ненормално покълналите, твърдите, свежите и мъртвите семена) и се закръглява нагоре, до цяло число. Това цяло число се приема за окончателен резултат;

б) изчисляват се останалите проценти, като се спазва принципа на закръгляване до най-близкото цяло число и се проверява сумата, която се получава;

в) ако сумата от процентите е 100, данните са окончателни и се записват в документа за лабораторен анализ и сертификата.

Ако сумата от процентите не е 100 се повтарят стъпки а) и б).

В случаи на равенство на десетичните части се следва следния приоритет: ненормално покълнали – твърди – свежи – мъртви семена.

6.8.2. Толеранси

Анализът за кълняемост се приема за надежден, само ако разликата между повторението с най-голям брой покълнали семена и това с най-малък е в рамките на допустимите отклонения. За да се провери надеждността на анализа за кълняемост средният процент от повторенията се закръглява до най-близкото цяло число и се проверява в Таблица 2. Резултатът е надежден, ако разликата между най-доброто и най-лошото повторение в анализа не надвишава предвиденото в таблицата. Тази процедура се прилага най-малко за категорията на нормално покълналите.

Ако разликите между повторенията надвишават предвиденото в Таблица 2 трябва да бъде направен повторен анализ. Ако резултатът от втория анализ, при използване на същия метод е в толерансите, посочени в Таблица 3, с резултата от първия анализ, на сертификата трябва да бъде записан осреднения резултат от двата анализа.

Ако вторият резултат не е в толеранс спрямо първия (т.е. разликата между двата резултата от анализите надвишава допустимото отклонение, посочено в Таблица 3), трябва да се направи трети анализ при използване на същия метод. Ако трите резултата от теста са в толеранс (т.е. разликата между трите резултата от теста не надвишава толеранса, посочен в Таблица 4), на сертификата трябва да бъде записан осреднения резултат от трите анализа.

Ако трите резултата от теста не са в толеранс (т.е. разликата между трите резултата от теста надвишава толеранса, посочен в Таблица 4), се прави сравнение по двойки от трите анализа (сравнение между анализи 1 и 3 и анализи 2 и 3, за анализи 1 и 2 вече е установено, че са извън толерансите). Ако резултатите, от които и да е две двойки анализи не са в толерансите се прави четвърти анализ.

Средната стойност от четирите резултата от анализите, при които е използван едни и същи метод, трябва да бъде записана на сертификата, ако четирите резултата от анализите са в толеранс (т.е. разликата между четирите резултата от анализите не надвишава толеранса, посочен в Таблица 5).

Ако четирите резултата от анализите не са в толеранс (т.е. разликата между четирите резултата от анализите надвишава посочения толеранс в Таблица 5), за резултат се дава най-високият съвместим резултат от сравнението на три анализа (т.е. сравнение на анализи 1, 2 и 4; анализи 1, 3 и 4; и анализи 2, 3 и 4). В сертификата се записва резултатът от тройката с резултат, който е в допустимите отклонения.

Ако след извършването на сравнение от тройки тестове не се получава съвместим резултат, на сертификата трябва да бъде записан най-високият съвместим резултат,

получен при сравнение на три двойки от четирите анализа (т.е. сравнение на анализи 1 и 4; анализи 2 и 4; и анализи 3 и 4).

Ако след извършване на сравнението на тези три двойки от анализи не се получава резултат, който е в допустимото отклонение не се дава резултат от анализа и заявителят се информира, че пробата има неприемливи вариации в кълняемостта.

Анализът за кълняемост за издаване на ISTA оранжев международен партиден сертификат, за сертификация по ЗППМ и при завка от клиент се базира на 400 семена. На сертификата се записва използваният метод.

Ако анализът е за издаване на ISTA оранжев международен партиден сертификат и е проведен на по-малко от 400 броя семена, броят на анализиранията семена трябва да бъде записан в сертификата.

6.8.3. Таблици за толеранси

За да се определи дали резултатът от анализ кълняемост е надежден се изчислява осреднен процент кълняемост от всичките повторения. Намира се мястото на средния процент кълняемост в Таблица 2 и съответния толеранс в колоната за толерансите. Ако разликата между най-високия и най-ниския процент кълняемост в повторенията не превишава толеранса анализът може да се счита за достоверен.

Таблиците 3, 4 и 5 дават толерансите за средния процент кълняемост от повторенията за нормално покълналите, ненормално покълналите, мъртвите, свежите или твърдите семена, когато анализите са проведени на една и съща или различна проба от същата партида в една и съща лаборатория. Таблица 3 се използва за два анализа, Таблица 4 – за три и Таблица 5 – за четири. За да се прецени дали анализите са сравними се изчислява среден резултат от анализите и се намира мястото му в съответната таблица. Ако разликата в резултатите от съответните анализи не надвишава толеранса, посочен в колоната за толеранси, анализите са сравними.

Таблица 6 дава толерансите за средния процент кълняемост от повторенията за нормално покълналите, ненормално покълналите, мъртвите, свежите или твърдите семена, когато анализите са проведени на една и съща или различни проби от една партида в две лаборатории.

Таблица 2
Толеранси между най-високия и най-ниския процент кълняемост в повторенията при анализ за кълняемост
Четири повторения по 100 семена

Среден процент кълняемост		Толеранси
51-100%	0-50%	
99	2	5
98	3	6
97	4	7
96	5	8

95	6	9
93-94	7-8	10
91-92	9-10	11
89-90	11-12	12
87-88	13-14	13
84-86	15-17	14
81-83	18-20	15
78-80	21-23	16
73-77	24-28	17
67-72	29-34	18
56-66	35-45	19
51-55	46-50	20

Таблица 3

**Толеранси за резултатите от два анализа на една и съща или друга проба от същата партида, анализирани в една и съща лаборатория
Два анализа по 400 семена**

Осреднен резултат от двата анализа за кълняемост	Осреднен резултат от двата анализа за кълняемост	Толеранси
98-99	2-3	2
95-97	4-6	3
91-94	7-10	4
85-90	11-16	5
77-84	17-24	6
60-76	25-41	7
51-59	42-50	8

Таблица 4

**Толеранси за резултатите от три анализа на една и съща или друга проба от същата партида, анализирани в една и съща лаборатория
Три анализа по 400 семена**

Осреднен резултат от трите анализа за кълняемост	Осреднен резултат от трите анализа за кълняемост	Толеранси
99	2	2
97-98	3-4	3
94-96	5-7	4
90-93	8-11	5
85-89	12-16	6
78-84	17-23	7
66-77	24-35	8
51-65	36-50	9

Таблица 5

**Толеранси за резултатите от четири анализа на една и съща или друга проба от същата партида, анализирани в една и съща лаборатория
Четири анализа по 400 семена**

Осреднен резултат от четирите анализа за кълняемост	Осреднен резултат от четирите анализа за кълняемост	Толеранси
99	2	2
97-98	3-4	3
95-96	5-6	4
92-94	7-9	5
88-91	10-13	6
82-87	14-19	7
74-81	20-27	8
60-73	28-41	9
51-59	36-50	10

Таблица 6

Толеранси за резултати от два анализа, направени в различни лаборатории на една и съща или различни проби от една и съща партида семена (двупосочен тест ниво на значимост 5%).

Два анализа по 400 семена.

Среден процент кълняемост от двата анализа		Толеранси
51-100%	0-50%	
99	2	2
98	3	3
96-97	4-5	4
94-95	6-7	5
91-93	8-10	6
88-90	11-13	7
84-87	14-17	8
79-83	18-22	9
74-78	23-27	10
68-73	28-33	11
60-67	34-41	12
51-59	42-50	13

6.9. Записване на резултатите от анализ кълняемост

Резултатите от анализа се записват на предвидените за това места в работната бланка, документа за лабораторен анализ и сертификатите както следва:

– реалната продължителност на анализа в дни, като в този период не се включват дните за нарушаване на физиологичния покой или някакво друго третиране;

– процентите, закръглени до цяло число, на нормално покълналите, твърдите семена, свежите семена, ненормално покълналите и мъртвите. Ако резултатът за която и да е от четирите категории е нула на документите се записва „0“;

– ако заявителят е поискал анализът да приключи при достигане на определен процент кълняемост, преди дата на крайно отчитане, на документите се записва само процентът на нормално покълналите. За всички останали категории се записва „Н“.

В графата „Други определения“ задължително се записва следната информация:

– броя на семената в анализа за кълняемост, ако са по-малко от 400;

– методът, от Таблица 1 на Приложение 1, най-малко абривиатурата на субстрата и температурата;

– третиране или метод за нарушаване на физиологичния покой, ако е приложимо;

– продължителността в дни на третирането или метода за нарушаване на физиологичния покой;

– при поискване може да се докладва процент на кълняемост, достигнат за периода, посочен в Таблица 1 на Приложение 1, ако периодът е бил удължен след посочения в таблицата период: Записът е „След определения период от ... дни за анализ кълняемост е достигнат ...% кълняемост.“ („After the prescribed period of ... days, there were ... % normal seedlings.“);

– методът за оценка на свежите семена – разрязване, тетразолов разтвор или изваждане на зародиш, когато се счита, че след края на анализа са останали повече от 5% свежи семена;

– ако заявителят е посочил, че иска анализът да бъде приключен при достигане на предварително посочен от него процент на кълняемост: Записът е „По искане на заявителя, анализът е приключен на ... ден. Предписаният период за анализ е ... дни.“ (By the applicant' request the analysis was completed on ... day. The prescribed period for analysis is ... days.)

По искане на заявителя може да бъде направено отчитане на броя на нормалните кълнове от 100 МСЕ, броя на МСЕ с един, два или повече нормални кълна. Може да бъде отчетена пропорцията на МСЕ с един, два или повече нормални кълна. Пропорцията се отчита като процент от общия брой МСЕ с един нормален кълн.

1. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1	Методи за кълняемост
Приложение 2	Речник
Приложение 3	Третираня и методи за нарушаване на физиологичния покой на семената

8. Алгоритъм на дейността

