آزمون سلامتی بذر و بررسی کیفیت بذرهای آلوده در مقایسه با بذرهای سالم چند گونه از گیاهان مرتعی و دارویی

محمد علی علیزاده[1]

چکیده

از آنجایی‌که براساس معیارهای اتحادیه بین‌المللی آزمون بذر یکی از آزمونهای مهم، آزمون سلامتی بذر بوده و همچنین قارچها و آفات بذرزاد باعث کاهش قوه نامیه و بنیه بذر می‌گردند، آزمون سلامتی بذر اعم از تشخیص قارچها و آفات بذرزاد یکی از موارد اجتناب ناپذیر می‌باشد. در این تحقیق، بذرهای ارسالی از مناطق مختلف کشور به آزمایشگاه تکنولوژی بذر، پس از بررسی از نظر تمیزی و خلوص فیزیکی، از نظر میکوفلور و آفات بذرزاد نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند و آثار خسارت آفات روی بذر بعضی از گونه‌ها مورد توجه قرار گرفت، اما اثری از مراحل دوره زندگی حشره کامل، لارو و شفیره وجود نداشت، از این رو بذرهای آفت زده از سالم جدا گردیدند. همچنین جهت کشف میکوفلور بذرهای آلوده از نظر علائم خسارت، شکل لکه‌های ایجاد شده روی بذر و رنگ آنها مورد بررسی قرار گرفتند. بذرهای آلوده در محیط کشت آگاردار کشت شده و بعد قارچهای بذرزاد نظیر پنی سیلیوم, آلترناریا, آسپرژیلوس، ریزوپوس و فوزاریوم آنها شناسایی گردید. همچنین کیفیت بذر از نظر درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذرهای آلوده به قارچ انباری با بذرهای سالم مورد مقایسه قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: آزمون سلامتی بذر، قارچها و آفات بذرزاد، جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی

---

۱ – عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، صندوق پستی ۱۱۶– ۱۳۱۸۵، تهران

مقدمه

براساس معیارهای اتحادیه بین المللی آزمون بذر (ISTA، ۱۹۸۵) آزمونهای تشخیص آفات و قارچهای بذرزاد به شرح زیر انجام می‌گیرد. آزمون تشخیص آفاتی که در سطح بذرها فعالیت داشته، با استفاده از روشهای فیزیکی و شیمیایی صورت می‌گیرد. روشهای فیزیکی شامل غربال کردن و بوجاری بذرها، شناور کردن بذرها در محلول آب و نمک و استفاده از تله می‌باشد. در روش شیمیایی جهت کشف آفاتی که در سطح بذر فعالیت دارند استفاده از تله‌های غذایی و فرمونی توصیه می‌شود. برای تشخیص آفاتی که در داخل بذر فعالیت دارند، از روشهای فیزیکی نظیر سوند زدن و استفاده از اشعه ایکس توصیه شده و در روش شیمیایی برای تشخیص آفات و قارچها از طریق مواد رنگی و انیدرید کربنیک انجام می‌گیرد (Richter، Richter,۱۹۷۵ و Tchalale, ۱۹۹۱ و Richter, ۱۹۹۳).

آزمونهای تشخیص قارچهای بذرزاد می‌تواند به سه روش مختلف و بدون قرار گرفتن بذر در شرایط رشد و نمو[1] انجام می‌پذیرد. در روش اول، بذرهای خشک به‌وسیله چشم غیر مسلح مورد بررسی قرار می‌گیرند (Henrik و Mathur, ۱۹۹۳). در روش دوم، آزمایش با نرم کردن و حل کردن بذرهای نرم شده در آب و اضافه کردن مقداری مواد رنگی معرف به داخل محلول حاوی بذرهای نرم شده و مشاهده اندامهای رویشی و زایشی قارچها انجام می‌گیرد. در روش سوم، آزمایش بذر به‌وسیله قرار دادن بذرها در داخل آب، سانتریفیوژ کردن نمونه‌های بذر و همچنین با اضافه کردن چند قطره مواد رنگی معرف به عصاره بذر و رسوب دادن آنها و بعد با نمونه‌برداری از عصارهای رسوب داده شده و مطالعه عصاره در زیر میکروسکوپ می‌توان پی به وجود قارچ برد(Neergaard، ۱۹۷۹، Pathak و همکاران ، ۱۹۷۸).

---

1 Without incubation

آزمونهای تشخیص بذرهای قرار گرفته در شرایط رشد و نمو نیز به سه روش قابل انجام است. در روش اول، از آزمون بلوتر استفاده می‌شود. در این روش بذرها در چهار تکرار ۵۰ تایی در پتری دیش استریل و روی کاغذ صافی استریل کشت شده و بعد با قرار دادن نمونه در شرایط انکوباتور با تناوب ۱۲ ساعت نور و ۱۲ساعت تاریکی در دمای (۳ ± ۲۰) درجه سانتیگراد، قارچ رشد کرده و بعد با نمونه‌برداری و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، حضور و نوع قارچ مشخص می‌شود (Maguire و Gabrielson,۱۹۸۳). در روش دوم، از انواع محیطهای کشت آگاردار و با کشت دادن بذرها نظیرآزمون بلوتر در محیط انکوباتور، حضور و نوع قارچ مشخص می‌شود (Henrik و Mathur, ۱۹۹۳). در روش سوم از آزمون تعیین علائم بیماری روی گیاهچه‌ها استفاده می‌شود. بذرها در این روش در گلدان استریل حاوی خاک استریل در محیط قابل کنترل گلخانه از نظر درجه حرارت و نور کشت شده و در صورت آلوده بودن بذرها به قارچ، علائم مشخص بیماری قارچی روی گیاهچه‌ها بوجود می‌آید که از روی این علائم، نوع و وجود قارچ مشخص می‌شود. در این تحقیق از روش نوع دوم استفاده شده است (Henrik و Mathur, ۱۹۹۳).

مواد و روشها

روش کار در آزمونهای تشخیص آفات و قارچهای بذرزاد براساس روش پیشنهادی اتحادیه بین‌المللی آزمون بذر (ISTA، ۱۹۸۵) بود. با توجه به بذرهای ارسالی از استانها (استان زنجان، قم و ایلام) به بانک ژن، ابتدا بذرها بوجاری شد. بعد از کامل شدن مرحله خلوص فیزیکی، بذرها با داشتن کد مشخص، از هر استان جهت بررسی و مشاهده از نظر سلامتی بذرها توسط بینوکولر نوری مورد بررسی و بازرسی قرار گرفتند. در ادامه، نمونه‌های سالم با نمونه‌های آلوده مقایسه شده و مقداری از بذر هر نمونه، جهت کشت و بررسی نوع قارچ و همچنین تعیین قوه نامیه مورد بررسی و

مقایسه قرار گرفتند. نمونه‌های آلوده در لوله‌های نمونه‌گیری قرار داده شدند. از آنجایی‌که آثار خسارت آفات روی بذرها وجود داشت، اما هیچ یک از مراحل زندگی حشرات، اعم از تخم، لارو، شفیره و حشره کامل در نمونه‌های بذر وجود نداشت. بیولوژی آفات در آزمایشگاه مورد بررسی قرار نگرفت. جهت بررسی نوع قارچ، از محیط کشت آگاردار به‌نام (PDA)[1] استفاده شد. ابتدا ۳۹ گرم از محیط کشت مذکور وزن شده و بعد در دو شیشه آزمایش به نسبت مساوی ریخته شد و حجم هر یک از شیشه‌ها به ۵۰۰ سی‌سی رسانیده شد. شیشه‌های حاوی محیط کشت به‌وسیله اتوکلاو استریل شدند. بعد از سرد شدن، تحت شرایط لامینار فلو[2] مجهز به نور ماوراء بنفش، محیط کشت در پتری دیشهای استریل ریخته شد و سپس در شرایط استریل باقی ماندند تا منجمد شدند. از هر نمونه بذر مشکوک آلوده به قارچ دو تکرار با شرایط بدون استریل بذر و یک تکرار با استریل بذر توسط هیپو کلرور سدیم، کشت شدند. در هر واحد آزمایشی از سه عدد بذر استفاده شد. نمونه‌های مورد کشت در شرایط انکوباتور قرار گرفتند. بعد از مدت یک هفته ازنمونه‌های مورد کشت نمونه‌گیری شده و بعد روی لام و لامل با محلول بلو دی متیل آمین رنگ‌آمیزی شده و زیر میکروسکوپ نوری، جنس قارچها، مشخص شد.

نتایج

بیشتر قارچهای جدا شده از بذرها، از جمله قارچهای انباری بوده و باعث پایین آوردن قوه نامیه بذرها می‌شوند. بیشتر این قارچها به جنسهای پنی سیلیوم، آسپرژیلوس، فوزاریوم، ریزوپوس و آلترناریا تعلق دارند. نام علمی گونه ارسالی از

1- Potato Dextroz Agar

2- Laminar Flow Cabinet

استانها همراه با جنس قارچ جدا شده در جدول شماره ۱ ارائه شد، همچنین علاوه بر بذرهای گونه‌های مندرج در جدول شماره ۱ از بذرهای دیگر گونه‌ها هم استفاده شد. با توجه به جدول شماره ۱ بذرها در شرایط رشد و تکامل، جمع‌آوری، عمل‌آوری، حمل و نقل و نگهداری در انبار به بعضی از قارچهای انباری آلوده هستند. شکلهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی چهار جنس قارچ انباری (پنی سیلیوم، آسپرژیلوس، فوزاریوم و آلترناریا) جدا شده از بذرها که از نظر خسارت در انبار دارای اهمیت اقتصادی هستند، در اشکال شماره ۱ تا ۸ نشان داده شده‌اند.

برآورد درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای گونه‌ها

با توجه به جداسازی بذرهای آلوده و غیرآلوده گونه‌های مندرج در جدول شماره ۱ و گونه‌های دیگر، بذرهای آلوده به‌عنوان تیمار و غیرآلوده به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. داده‌های بدست آمده از درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. بذرهای سالم گونه‌ها (شاهد) با بذرهای آلوده (تیمار) مقایسه آماری شدند. بذر گونه ***Marrubium vulgare*** با شماره کد (۱۰۹) درمقایسه با شاهد از نظر درصد و سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را نشان داد، (جدول شماره ۲). بذرهای بعضی از گونه‌ها نظیر ***Vitex Pseudo-negundo, Achillea sp.*** با کدهای ٤٢٨٥، ٤٢٨٠) و همچنین بذر گونه با کد شماره (٤٢٨٩) در مقایسه با شاهد تفاوت معنی‌دار را نشان ندادند، (جدول شماره ۲). بذر گونه‌های دیگر ***Achillea sp.***، ***Dactylis glomerata Astragallus sp.***, با کدهای (٤٢٧٥، ٤٢٨٢، ٤٢٨٠) هم در درصد و سرعت جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (جدول شماره ۲).

بذر گونه ***Oryzopsis virescens***، با کد ٤٢٧٤ از نظر درصد جوانه‌زنی با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت، درصورتی‌که از نظر سرعت جوانه‌زنی میان بذر گونه فوق با شاهد تفاوت معنی‌دار وجود داشت، (جدول شماره ۲). همچنین میان بذر گونه‌های

Plantago ovata, و *Melilotus officinalis* با کدهای (٤٢٧٦ و٤٢٧٣) هم از نظر درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی با شاهد آنها تفاوت معنی‌دار وجود داشت، (جدول شماره ۲). درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر گونه *Hyoscyamus niger* با کد ٤٢٧٠ با شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت (جدول شماره ۲).

بحث

علائم خسارت آفات وجود داشته، ولی به‌دلیل عدم وجود مراحل بیولوژیکی حشرات از روشهای شناسایی حشرات استفاده نشد. براساس مشاهدات عینی، قطعیت آلوده بودن بذرهای کشت شده به قارچ انباری ثابت گردید. با توجه به بالا بودن درصد و سرعت جوانه‌زنی نمونه‌های شاهد با نمونه‌های آلوده به قارچ، تاثیر قارچ را در کاهش کیفی بذر بهتر می‌توان مشاهده کرد. به‌عبارت دیگر اختلاف معنی‌دار میان اکثر بذرهای آلوده با بذرهای سالم (شاهد) گونه‌ها در دو عامل کیفی بذر (درصد و سرعت جوانه‌زنی) نشانگر اثر قارچ روی جنین بذر می‌باشد.

شایان ذکر است که بعضی از گونه‌ها نظیر *Achilla tenuicaulis* و *Vitex pseudo-negundo,* با کدهای (٤٢٨٥ و ٤٢٨٠) و همچنین بذر گونه با کد شماره (٤٢٨٩) در مقایسه با شاهد در دو عامل کیفی بذر (درصد و سرعت جوانه‌زنی) تفاوت معنی‌دار نشان ندادند. همچنین بذر گونه *Oryzopsis virescens* با کد ٤١٧٤ در مقایسه با شاهد فقط در عامل کیفی درصد جوانه‌زنی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. به‌نظر می‌رسد که این نتیجه ارتباطی به تفاوت بذر سالم و آلوده ندارد، بلکه این موضوع به سازوکار خواب بذر ارتباط دارد. بیشتر بذرهای مرتعی دارای خواب فیزیکی (نفوذ ناپذیر بودن پوسته بذر به شرایط محیطی مثل آب و اکسیژن)، خواب

فیزیولوژیکی شامل نابالغ بودن جنین بذر[1] و یا عدم بلوغ فیزیولوژیک بذر[2]، عدم تعادل مواد غذایی بذر و خواب شیمیایی (مواد بازدارنده) هستند که لازم است مورد بررسی قرار گیرند.

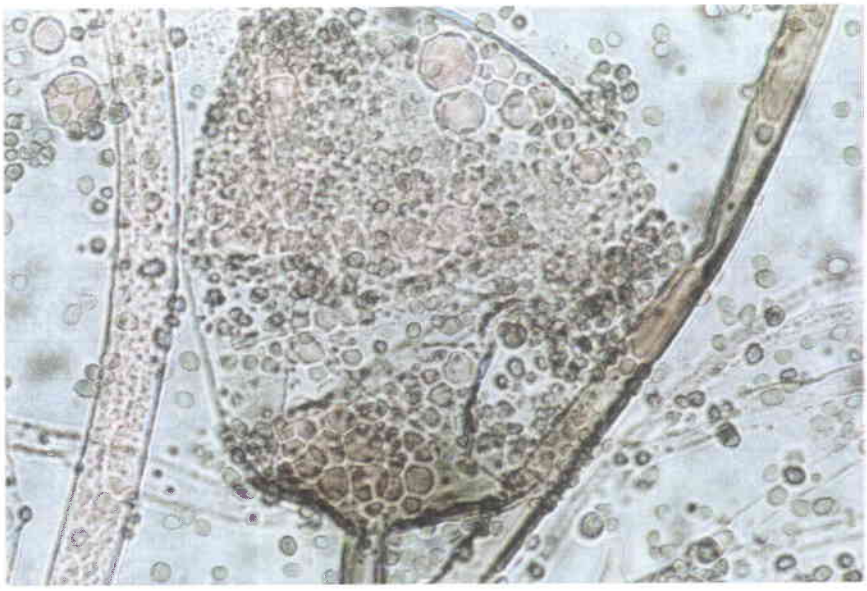
جدول شماره ۱: نام گونه گیاهی همراه با قارچهای جدا شده از بذر آنها

ردیف	کد	نام استان	نام علمی	خانواده	جنس قارچ انباری
۱	۱۰۵	ایلام	*Sanguisorba minor*	Rosaceae	ریزوپوس،آسپرژیلوس پنی سیلیوم
۲	۹٤	ایلام	*Trigonella spp*	Legominosae	ریزوپوس،آسپرژیلوس پنی سیلیوم
۳	۷	کرمان	*Prangos cheilanthicola*	Umbelliferae	ریزوپوس
٤	٦۱۹	زنجان	*Cicer sp.*	Papilonaceae	پنی سیلیوم
٥	٦٤۲	زنجان	*Rooa sp.*	Rosaceae	پنی سیلیوم
٦	٦٤۸	زنجان	*Hypericum sp.*	Hypericaceae	تریکو درما
۷	٦٥۳	زنجان	*Berberis sp.*	Beriberiacea	آسپرژیلوس
۸	٦٥۰	زنجان	*Agropyron sp.*	Poacea	آسپرژیلوس، پنی سیلیوم
۹	۸۸	قم	*Tanacceum polycephaleum*	Compositae	آسپرژیلوس، پنی سیلیوم
۱۰	۱۰۹	قم	*Marrabium vulgare*	Labitae	آسپرژیلوس، پنی سیلیوم، ریزوپوس
۱۱	٤۲۸۹	قم	*Chenopodium sp.*	Chenopodiaceae	آسپرژیلوس، پنی سیلیوم
۱۲	٤۲۸۰	قم	*Achillea sp.*	Compositae	ریزوپوس، آسپرژیلوس
۱۳	۱۳٤	قم	*Hypericum Scabrum*	Hypericaceae	آسپرژیلوس، پنی سیلیوم
۱٤	٤۲۸٥	قم	*Vitex psudo-neguna*	Verbenaceae	ریزوپوس، آسپرژیلوس پنی سیلیوم
۱٥	٤۲۸۲	قم	*Astragalus sp.*	Papilonaceae	ریزوپوس، آسپرژیلوس پنی سیلیوم، فوزاریوم
۱٦	٤۲۸۷	قم	*Achillea sp.*	Compositae	ریزوپوس
۱۷	۱	اردبیل	Matricaria chammomilla	Compositae	ریزوپوس، آسپرژیلوس پنی سیلیوم

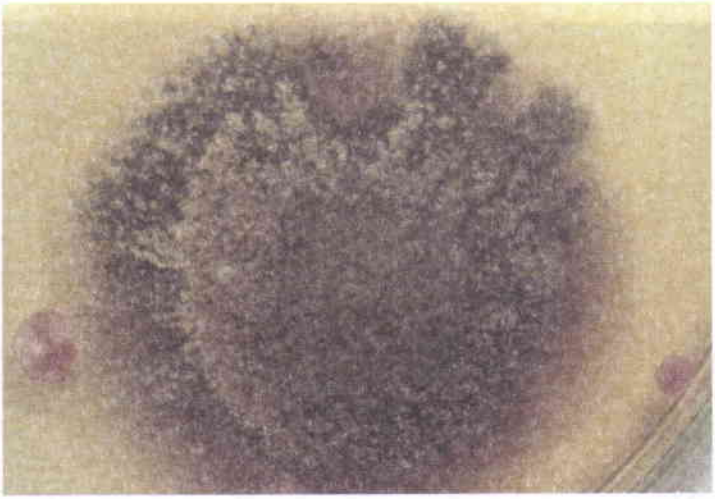
1 Immature embryo

2 Physiological maturituy

شکل شماره ۱: مشاهده ماکروسکوپی از جنس فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های بذرها

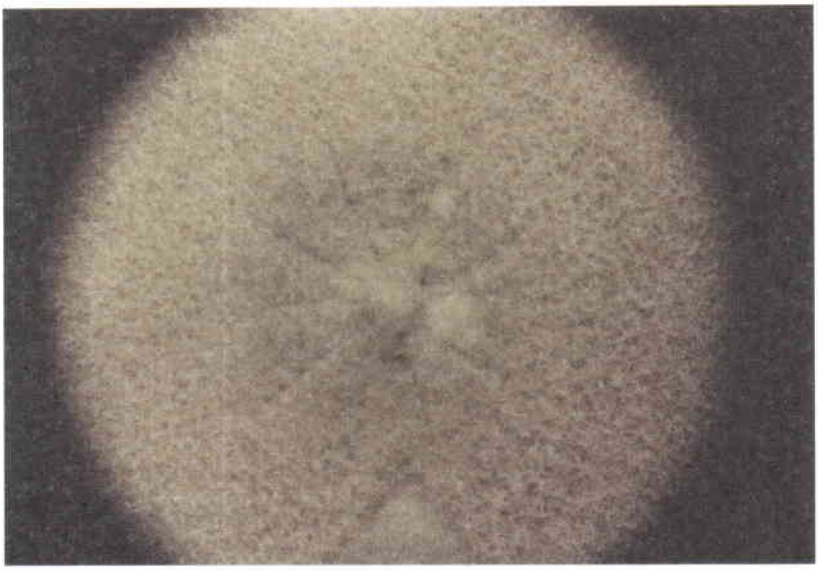


شکل شماره ۲: مشاهده میکروسکوپی قارچ از جنس فوزاریوم جدا شده از نمونه‌های بذرها



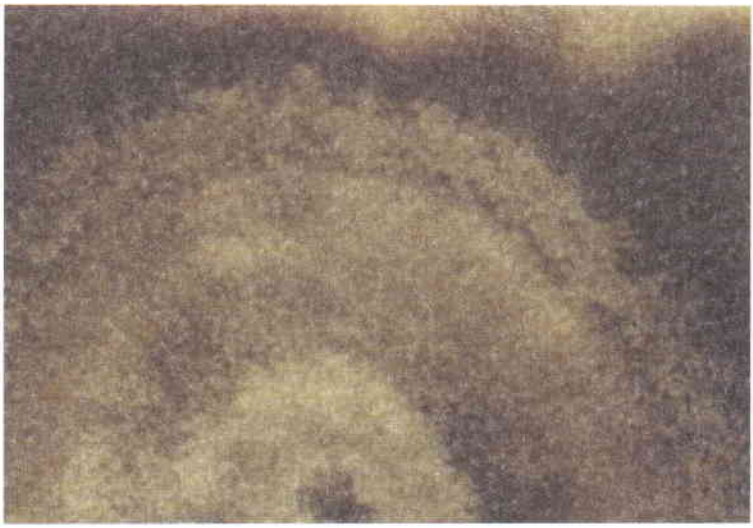
شکل شماره ۳: مشاهده ماکروسکوپی قارچ از جنس آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بذرها

شکل شماره ٤: مشاهده میکروسکوپی قارچ از جنس آسپرژیلوس جدا شده از نمونه‌های بذرها

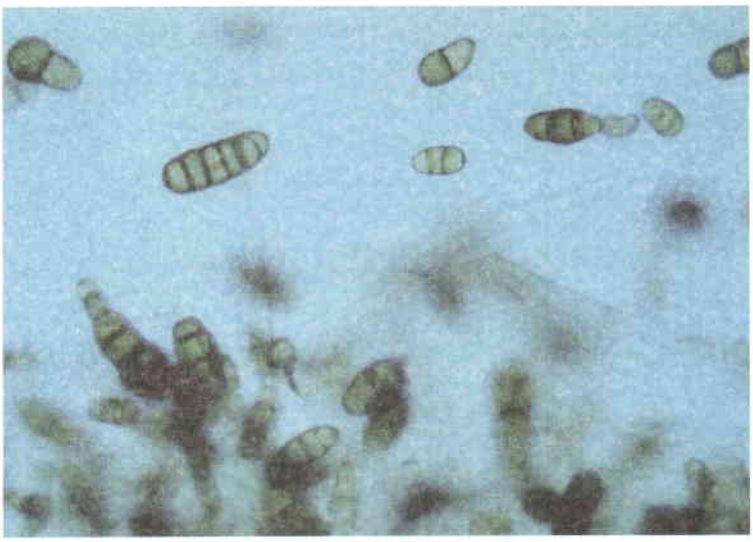


شکل شماره ۵: مشاهده ماکروسکوپی از جنس پنی سیلیوم جدا شده از نمونه‌های بذرها

شکل شماره ٦: مشاهده میکروسکوپی قارچ از جنس پنی سیلیوم جدا شده از نمونه‌های بذرها



شکل شماره ۷: مشاهده ماکروسکوپی از جنس آلترناریا جدا شده از نمونه‌های بذرها



شکل شماره ۸: مشاهده میکروسکوپی قارچ از جنس آلترناریا جدا شده از نمونه‌های بذرها

جدول شماره ۲: نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برای درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی گونه‌های مورد مطالعه زیر:

نام گونه‌ها	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی
Marrubium vulgare	۱۲۰۲/۷۵۰ **	۳۱۳٦۸۱ **
Vitex Pseudo-negundo	۲۳/۸۸۰ ns	۲/۱۸٤ ns
Achilla albicaulis	٤۲/۹۸۷ ns	۲٤/٤۰۲ **
Chenepodium sp.	۱۰/٦٦۷ ns	۰/۲۳۲ ns
Achilla sp.	٤۰٥۳/۲۸۳ **	۹۹/٤٥ **
Astragallus sp.	۱۰٥۹٤/۰۸۲ **	۲۹۲/۷٤۱ **
Dactylis glomerata	٦۷/٥۳٦ **	٦۷/۳٤ **
Oryzopsis Virescens	۹٦/٥٦۱ ns	٥۸/۹۰۷ **
Plantago ovata	٦۷/۲۰۱ **	۲٤/۰٤۰ **
Melilotus officinalis	۱۲۷۰۳/۳٦۱ **	۲۱۸/٦٤۸ **
Elyoscyamus niger	۲۱٤//۸۰۲ ns	۲۱٤/۱٤۰ *

** : اختلاف معنی‌دار را درسطح یک درصد، * : اختلاف معن دار را درسطح پنج درصد و ns: عدم اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد را نشان می‌دهد.

منابع

Henrik, J.H. and Mathur, S.B. 1993. Testing for seed-borne fungi, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries, Ryvangs Alle 78, DK-2900 Hellerup, Denmark, In Qurantine For Seed, FAO Plant Production and Protection Paper (Food and Agriculture Organization of the United Nations) 1993 , 119, P. 163-167.

International Seed Testing Association, 1985. Seed Sci and Technology, 13. No. 2.

Maguire, J.D. and Gabrielson, R.L. 1983. Testing Techniques For Phoma lingam. Seed Sci
and Technol, 8. P. 599-605.

Neergaard, P., 1979. Seed Pathology. Vol. I and II. The Macmillan Press, London, UK.

Pathak, V.K., Mathur, S.B. and Neergaard, P. 1978. Detection of peronospora manshurica (Naum.) Syd. In seeds of soybean, Glycine max. EPPO Bulletin, 8: 21-28.

Richter, K. 1975. Vorratsschutz in der pflanzenproduktion. Leipzig. 205PP.

Richter, K., 1993. Seed health for Insects, In Qurantine For Seed, FAO Plant Production and Protection Paper (Food and Agriculture Organization of the United Nations) , 119, 189-195.

Richter, K., and Tchalale, P. 1991. Zur Eignung der Flotationsmethod fur die Fruherkennung des Innenbefalls von Getreide mit Sitophiluss oryzae (L.) (Coleoptera : Curculionidae). Unpublished.