(مقاله کوتاه)

معرفی یک آزمون جدید برای پیش‌بینی قابلیت حیات بذور و تولید گیاهچه نرمال: آزمون نیتروبلوتترازولیوم

مهدی شعبان*[۱]، فرشید قادری‌فر[۲]، حمیدرضا صادقی‌پور[۳]، احد یامچی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری علوم و تکنولوژی بذر، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

[۲]دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

[۳]دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه گلستان، گرگان

[۴]استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۲۳

چکیده

تفسیر آزمون تترازولیوم نیاز به تخصص بالا داشته که از معایب اصلی آن می‌باشد. معرفی روش‌های نوین و جایگزین می‌تواند محققین را در درک بالاتر تعیین قابلیت حیات بذور یاری نماید. این آزمایش به منظور دستیابی به یک روش نوین و دقیق‌تر جهت پیش‌بینی دقیق‌تر قابلیت حیات بذر و تخمین درصد گیاهچه نرمال تولیدی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۱۳۹٤ اجرا شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. تیمارها شامل ۸ سطح (انبارداری طبیعی ۲، ٤ سال، زوال مصنوعی ۱، ۲، ۳، ٤، ۵ روز و شاهد) بودند. نتایج نشان داد اثر زوال بر درصد جوانه‌زنی، درصد گیاهچه نرمال و شاخص قدرت بذر معنی‌دار بود. افزایش شدت زوال مصنوعی و طول مدت انبارداری طبیعی درصد جوانه‌زنی، درصد گیاهچه نرمال و شاخص قدرت بذر را کاهش داد. همچنین در این مطالعه مشخص شد که الگوی رنگ‌پذیری جنین در تیمار نیتروبلوتترازولیوم در مقایسه با تترازولیوم با درصد جوانه‌زنی، شاخص قدرت بذر و تولید گیاهچه نرمال در بذور نخود هم‌خوانی بیشتری داشت. دستاوردی که در این مطالعه حاصل شد این است که به جای استفاده از تترازولیوم می‌توان از نیتروبلوتترازولیوم در جهت بررسی قابلیت حیات بذور و پیش‌بینی میزان گیاهچه نرمال تولیدی استفاده نمود. می‌توان نام این آزمون جدید را آزمون نیتروبلوتترازولیوم نهاد.

واژه‌های کلیدی: جنین، جوانه‌زنی و دستاورد نوین

*نویسنده مسئول: shaban.mehdi@gmail.com

مقدمه

انجام آزمون‌های قابلیت حیات بذر برای بررسی کیفیت محموله بذری جهت کشت در مزرعه مهم می‌باشد. اگر در زمان کاشت، محموله بذری از کیفیت مناسبی برخوردار نباشد ممکن است تراکم مورد انتظار در مزرعه حاصل نشده و در نتیجه عملکرد مورد انتظار نیز حاصل نخواهد شد (Aslam et al., 2010). پس قبل از کاشت هر محموله بذری آگاهی از کیفیت آن می‌تواند به افزایش تولید در واحد سطح کمک نماید. آزمون جوانه‌زنی در جهت دستیابی به میزان بذور جوانه‌زده در مزرعه از اهمیت بالایی برخوردار است. بذرهایی که در آزمون جوانه‌زنی جوانه نزده‌اند یا غیرزنده بوده و یا دارای کمون هستند. راهکارهای تشخیص این دو نوع بذر نیز انجام برخی آزمون‌های بیوشیمیایی معرفی شده از طرف ایستا مانند آزمون تترازولیوم می‌باشد.

آزمون تترازولیوم یکی از آزمون‌های بیوشیمیایی سریع در تعیین قابلیت حیات بذور می‌باشد (Lakon, 1942) که بر مبنای واکنش تترازولیوم با آنزیم‌های دی‌هیدروژناز ناشی از تنفس بذر آبنوشی شده تولید رنگ قرمز فورمازان نموده و وجود این رنگ قرمز نشان‌دهنده زنده بودن بذر می‌باشد (Ghaderi-Far et al., 2012). در این آزمون محلول بی‌رنگ تری فنیل تترازولیوم کلراید در زمان آبنوشی بذور به درون بافت‌های بذری نفوذ کرده و در پروسه احیای سلول‌های زنده هیدروژن را از دهیدروژناز دریافت نموده و طی این پروسه تولید رنگ قرمز ثابت و غیر قابل انتشاری به نام تری‌فنیل فورمازان نموده که نشان دهنده زنده بودن قسمت‌های رنگ گرفته نسبت به قسمت‌های بدون رنگ می‌باشد و بر طبق الگوی رنگ‌پذیری تترازولیوم کلاس‌های مختلفی در جهت تفسیر این آزمون شناسایی و معرفی می‌شوند (Lakon, 1942; Ghaderi-Far et al., 2012 and Aslam et al., 2010). به هر حال چیزی که در آزمون تترازولیوم مهم می‌باشد رنگ‌پذیری جنین می‌باشد و رنگ‌پذیری سایر قسمت‌های بذر از قبیل آندوسپرم اهمیت چندانی ندارد (Donald, 1994). در آزمون تترازولیوم توزیع توپوگرافیکی رنگ‌پذیری و همچنین شدت رنگ‌پذیری جنین نشان‌دهنده میزان قابلیت حیات بذر می‌باشد و قابلیت حیات تعیید شده در این آزمون با توانایی جوانه‌زنی بذور همبستگی دارد (Harty et al., 1972). از مزایای این آزمون سرعت زیاد آن و همچنین تعیین قابلیت حیات بذور دارای کمون و بدون کمون می‌باشد (Ghaderi-Far and Soltani, 2011). با این وجود این آزمون قدیمی و مرسوم دارای معایبی می‌باشد. از جمله اینکه تفسیر این آزمون بسیار سخت بوده و نیاز به مهارت بسیار بالا دارد که باعث شده در حال حاضر کمتر از این آزمون استفاده شود. همیشه نمی‌توان به نتایج آزمایشگاهی (آزمایش تترازولیوم) اطمینان نمود، چون نتایج حاصل از این آزمون نمی‌تواند نشان‌دهنده میزان واقعی قوه نامیه بذر باشد و تنها زنده بودن جنین را نشان می‌دهند و ممکن است جنین با وجود زنده بودن قابلیت جوانه‌زنی نداشته باشد و یا توانایی تولید گیاهچه نرمال را نداشته باشد (Mollashahi et al., 2009). بنابراین استاندارد نمودن این آزمون (Ghaderi-Far and Soltani, 2011) و یا ارائه روش‌های نوین و جایگزین می‌تواند به محققین در جهت تعیین دقیق‌تر قابلیت حیات بذور و پیش‌بینی درصد گیاهچه‌های نرمال تولیدی کمک نماید. از این رو هدف از اجرای این مطالعه یافتن روشی جایگزین یا مکمل برای آزمون تترازولیوم در زمینه پیش‌بینی بهتر درصد جوانه‌زنی و علاوه بر این، پیش‌بینی درصد گیاهچه نرمال تولیدی در مزرعه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه برای اولین بار به منظور مقایسه کارایی تترازولیوم و نیتروبلوتترازولیوم در ارزیابی قابلیت حیات بذور و پیش‌بینی میزان گیاهچه‌های نرمال تولیدی محموله بذری نخود در سال ۱۳۹٤ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گردید. تیمارهای آزمایش شامل انبارداری طبیعی بذور و بذور دارای زوال مصنوعی بودند. از بذور نخود رقم هاشم که به‌مدت دو و چهار سال در شرایط طبیعی انبار نگهداری شده بودند به‌عنوان تیمارهای زوال طبیعی و از بذور تازه برداشت شده به‌عنوان شاهد و همچنین بذور دارای زوال مصنوعی استفاده گردید. برای این کار بذرهای نخود در داخل ظروف پلاستیکی به ابعاد ۳/۵×۱۱×۱۱ سانتی‌متر که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود، قرار داده شد. سپس درب ظرف‌ها کاملاً بسته شده و در دمای ثابت ٤۳ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۱۰۰ درصد به مدت ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ روز در داخل انکوباتور قرار داده شد.

برای انجام آزمون جوانه‌زنی و رشد گیاهچه در هر تیمار زوال طبیعی و مصنوعی، ٤ تکرار ۲۵ تایی از بذر شمارش و روی دو عدد کاغذ حوله‌ای به ابعاد ٤۵×۳۰ سانتی‌متر قرار گرفته و با کاغذی دیگر روی بذرها پوشانده شد و طبق دستورالعمل ایستا به‌مدت ۸ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مرحله وزن خشک و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه نیز اندازه‌گیری شد (روش ساندویچ) (ISTA, 2012). برای جلوگیری از تبخیر رطوبت، حوله‌های کاغذی درون جعبه پلاستیکی دردار گذاشته شد. شمارش بذرها روزانه سه بار صورت می‌گرفت. معیار بذرهای جوانه‌زده خروج ریشه‌چه، به اندازه ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود. در کلیه تیمارهای دمایی منحنی پیشرفت جوانه‌زنی در مقابل زمان (ساعت)، ترسیم و زمان لازم برای ۵۰ درصد (D50) جوانه‌زنی از طریق درون‌یابی برآورد گردید. همچنین معکوس زمان تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی (1/D50) به‌عنوان سرعت جوانه‌زنی در نظر گرفته شد (با استفاده از برنامه جرمین) (Soltani and Maddah, 2011).

برای تعیین قابلیت حیات بذور ابتدا آنها را به‌مدت ٤ ساعت بین کاغذ صافی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا آبنوشی انجام شود. سپس به‌مدت ۲ ساعت در محلول یک درصد تترازولیوم و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از شستشو پوسته آنها حذف و از نمونه‌ها بذری و جنین با استفاده از استریومیکروسکوپ عکسبرداری از ۱۰ نمونه انجام شد (ISTA, 2003).

برای تعیین مکان دقیق تولید و فعالیت رادیکال سوپراکسید از روش رنگ‌آمیزی نیتروبلوتترازولیوم استفاده شد. جهت اعمال تیمار نیتروبلوتترازولیوم با استفاده با استفاده از محلول تریس HCl ۱۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، محلول ٦ میلی‌مولار نیتروبلوتترازولیوم تهیه شد. پس از آبنوشی بذرها به‌مدت ٤ ساعت، آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در محلول فوق و در دمای اتاق قرار داده و پس از رنگ‌گیری، جنین از بذر جدا شده و با آب شتشو داده شده و در نهایت استفاده از استریومیکروسکوپ عکسبرداری از ۱۰ نمونه انجام شد (Oracz et al., 2011). تجزیه داده‌های اصلی بدون تبدیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسات میانگین با آزمون LSD در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار زوال بر صفات درصدجوانه‌زنی، درصد گیاهچه نرمال و شاخص قدرت بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

در شرایط زوال مصنوعی با افزایش تعداد روزهای زوال درصد جوانه‌زنی بذرها و درصد گیاهچه نرمال کاهش یافت به‌طوری‌که بیشترین و کمترین میزان جوانه‌زنی در تیمار شاهد و زوال ۵ روز و به‌ترتیب به میزان ۹۶ و ۲٤ درصد مشاهده شد. همچنین بیشترین و کمترین درصد گیاهچه نرمال به‌ترتیب در تیمارهای شاهد (۹۵ درصد) و زوال مصنوعی ۵ روز (٤ درصد) مشاهده شد. همچنین بذرهایی که به‌مدت ٤ سال در انبار نگه‌داری شدند نسبت به بذرهایی که دو سال انبار شدند درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال کمتری داشتند. با توجه به افت درصد جوانه‌زنی در بذرهای نخود مشاهده شد که در تیمار سه روز زوال درصد جوانه‌زنی بذرها نسبت به شاهد حدود ۱۵ درصد کاهش یافته و در تیمار چهار سال انبارداری نیز افت جوانه‌زنی بذرها به همین میزان بود. در زوال طبیعی دو و چهار سال نسبت به زوال‌های شدید چهار و پنج روز افت درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال کمتر مشاهده شد. پیری تسریع شده به‌عنوان یک نشانگر برای طول عمر بذر در شرایط انبارداری طبیعی مورد استفاده قرار گرفته است (Demir and Mavi, 2008). زوال مصنوعی می‌تواند درجه خسارت به بذرها را ارزیابی نموده و از این طریق می‌توان طول مدت انبارداری طبیعی را پیش‌بینی نمود (Fabrizus et al, 1999). آزمون تسریع پیری بذر تحت شرایط دما و رطوبت نسبی بالا منجر به کاهش قدرت بذر شده و این روش میتواند برآوردی از نقصان خسارت به بذر طی انبارداری طبیعی را به ما ارائه دهد (Tina et al., 2008). در این آزمایش درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال در زوال تسریع شده شدید نسبت به انبارداری طبیعی کاهش بیشتری را نشان داد و مشاهده گردید که انبارداری بذرها به مدت دو سال نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری را در درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال نشان نداد. فرسودگی بذرهای نخود درصد جوانه‌زنی و در نهایت درصد گیاهچه‌های طبیعی حاصل از آنرا کاهش داده است (Roozrokh and Ghasemigolazani, 1998). در شرایط مختلف زوال طبیعی و مصنوعی دما و رطوبت نسبی محیط بر درصد جوانه‌زنی بذرها اثر گذاشته و افزایش دما و رطوبت محیط نگه‌داری بذر سبب تسریع زوال بذر می‌گردد (Nkang and Umoh, 1997) و با توجه به اینکه در شرایط زوال مصنوعی رطوبت و دمای محیط بالاست میزان خسارت وارد شده به بذر بیشتر بود و همین امر سبب نقصان درصد جوانه‌زنی بذرهای نخود و درصد گیاهچه نرمال گردید. افزایش طولانی مدت بذرها در انبار سبب افت جوانه‌زنی بذرها می‌گردد (Akhter et al., 1992). در این تحقیق نیز مشاهده گردید که شدت زوال در زوال‌های طبیعی و مصنوعی سبب کاهش کیفیت و در نهایت سبب کاهش حداکثر میزان جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال شد و شدت‌های زوال چهار و پنج روز سبب افت بیشتر این صفات نسبت به زوال طبیعی شد.

بذرهای دارای قدرت بالاتر کارکرد بهتری داشته و در نتیجه درصد جوانه‌زنی آنها تحت شرایط تنش‌های مختلف محیطی بیشتر شده و در نهایت درصد سبز و عملکرد بالاتری در مزرعه دارند (Ghasemigolazani et al., 1994). نتایج این تحقیق نشان داد تیمار شاهد دارای بالاترین میزان شاخص قدرت بذر بود و کمترین میزان آن مربوط به تیمار زوال تسریع شده پنج روز و در بین تیمارهای انبارداری طبیعی مربوط به تیمار چهار سال انبارداری بود (جدول۲). شاخص قدرت بذر در تیمار زوال طبیعی نسبت به زوال‌های مصنوعی چهار و پنج روز بیشتر بود. این شرایط می‌تواند به دلیل بالاتر بودن دما در زوال مصنوعی باشد زیرا دمای بالا در این شرایط به طور معنی‌داری سبب کاهش شاخص بنیه بذر می‌گردد (Soltani et al., 2009). به هر حال افزایش مدت زمان انبارداری و همچنین شدت‌های بالاتر زوال مصنوعی سبب کاهش میزان قدرت بذر گردید. در شرایط انبارداری طبیعی مدت زمان ذخیره بذر بر میزان قدرت حیات بذر اثر گذاشته (Panobianco, 2007) و با افزایش این مدت زمان، شاخص قدرت بذر نیز

کاهش یافت. در شرایط زوال مصنوعی نیز شاخص قدرت بذر به شدت در زوال‌های شدیدتر کاهش یافت. شاخص قدرت بذر به شدت تحت تأثیر زوال قرار گرفته و عملکرد نهایی را نیز کاهش می‌دهد (Hosseini, 2008). شاخص قدرت بذر معرف درصد و پتانسیل جوانه‌زنی بوده و هرچه بذر کیفیت پایین‌تری داشته باشد شاخص قدرت بذر آن کاهش یافته و در نتیجه درصد جوانه‌زنی نهایی نیز کاهش می‌یابد (Azad and Tobe, 1992). بذرهای گندمی که زوال یافته‌اند به دلیل قوه نامیه پایین‌تر، دارای درصد جوانه‌زنی و شاخص قدرت بذر کمتری نیز بودند. آنها بالاتر بودن شاخص قدرت بذر در شرایط عدم زوال را به دلیل بالاتر بودن ذخایر و اندوخته پویا عنوان نمودند (Mohsennasab et al., 2010). در این تحقیق مشاهده شده که شاخص قدرت بذر از ۱۰۰ درصد در تیمار شاهد به‌ترتیب به ۱۰ و ٤ درصد در تیمار چهار و پنج روز زوال مصنوعی کاهش یافت.

قبل از کاشت یک توده بذری میزان قدرت و قابلیت حیات آن را می‌توان از طریق برخی شاخص‌های بیوشیمیایی از قبیل آزمون تترازولیوم تا حدودی تعیین نمود. شدت رنگ پذیری در بذور زوال یافته تا ۳ روز تقریبا مشابه با تیمار شاهد بود ولی در تیمارهای ٤ و ٥ روز از شدت رنگ کاسته شد. در تیمارهای انبارداری طبیعی نیز میزان رنگ پذیری بذور مشابه با تیمار شاهد بود. رنگ‌پذیری بذور در تیمارهای شاهد، یک، دو و سه روز تقریباً مشابه با رنگ‌پذیری تیمارهای دو و چهار سال بود. در این تیمارها همه قسمت‌های بذور رنگ گرفته و به رنگ قرمز درآمدند. این نتایج نشان داد در این تیمارها بذور دارای قابلیت حیات بوده و توانایی جوانه‌زدن داشتند. در تیمار زوال ٤ روز از شدت رنگ‌پذیری بذور نسبت به سایر تیمارها کاسته شده که نشان از کاهش قابلیت حیات و در نتیجه کاهش میزان جوانه‌زنی در این تیمار می‌باشد. همچنین در تیمار پنج روز زوال مصنوعی از میزان رنگ‌پذیری بذور به شدت کاسته شده که نشان از کاهش شدید قابلیت حیات در این بذور می‌باشد. افت جوانه‌زنی و تولید گیاهچه نرمال که نشان از کاهش قدرت بذر می‌باشد، در تیمارهای زوال چهار و پنج روز به‌دلیل کاهش قابلیت حیات آنها می‌باشد. افزایش مدت زمان انبارداری طبیعی و شدت زوال مصنوعی درصد جوانه‌زنی و تولید گیاهچه نرمال را کاهش داد. این افزایش تا ۳ و حتی ٤ روز سبب تغییر زیادی در الگوی رنگ‌پذیری بذر و جنین نخود به وسیله‌ی تترازولیوم نشد و نمی‌توان به طور قاطع بیان نمود که در انبارداری ۲ و ٤ سال و زوال ۱، ۲، ۳ و حتی چهار روز قابلیت حیات بذر کاهش یافته است ولی در زوال ٥ روز ریشه‌چه و ساقه‌چه رنگ نگرفته که حاکی از عدم جوانه‌زنی و یا تولید گیاهچه غیر نرمال می‌باشد. در این آزمون تا زوال ٤ روز فقط می‌توان عنوان نمود که بذور زنده هستند ولی نمی‌توان در مورد تغییر درصد جوانه‌زنی، قدرت بذور و تولید گیاهچه طبیعی با قاطعیت اظهارنظر نمود.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، نمی‌توان از روی رنگ‌پذیری بذور بین تیمار شاهد و تیمارهای دارای زوال مصنوعی ۱، ۲، ۳ و ٤ روز و همچنین انبارداری طبیعی ۲ و ٤ سال تفاوتی قائل شد و با اطمینان نمی‌توان بیان نمود که کدام گروه تیماری دارای قابلیت حیات بالاتری هستند و فقط می‌توان عنوان نمود که این بذور دارای قابلیت حیات هستند. در این خصوص ابداع روش‌های نوین در تشخص دقیق‌تر درصد جوانه‌زنی و میزان تولید گیاهچه نرمال می‌تواند در درک درست قدرت یک محموله بذری و اعمال مدیریت صحیح کاشت در مزرعه و کارهای تولید، کنترل و گواهی بذر ما را یاری نماید. در این آزمایش پس از مطالعات گوناگون روی بذور و جنین نخود مشخص شد که ماده نیتروبلوتترازولیوم دارای این توانایی بوده و می‌توان تفاوت تیمارهای بذری که دارای اختلاف کمی در قابلیت حیات هستند را تمیز داده و درصد گیاهچه نرمال تولیدی را به طور دقیق‌تری پیش‌بینی نمود. نیتروبلوترازولیوم در جهت تعیین مکان‌یابی گونه‌های فعال اکسیژن به خصوص رادیکال سوپراکسید به کار برده می‌شود

(Leymarie et al., 2011). رنگ‌آمیزی با نیتروبلوتترازولیوم الگوی رادیکال سوپراکسید تولیدی را بیان نموده و تولید این گونه‌های فعال اکسیژن بیان کننده نقش‌های گوناگون آنها در سیگنال‌دهی سلول طی جوانه‌زنی از قبیل تعدیل حالت ردوکس سلولی می‌باشد (Dietz et al., 2010). بین تولید رادیکال سوپراکسید و رنگ‌میزی شده بوسیله‌ی نیتروبلوتترازولیوم و پس‌رسی بذور و فعال بودن آنها جهت جوانه‌زنی ارتباط نزدیکی وجود داشته (Oracz et al., 2011) و به عنوان پیامبر سلولی جهت وقوع جوانه‌زنی عمل نموده (Bailly, 2004) و سیگنال آنها سبب وقوع جوانه‌زنی بذر می‌گردد (Oracz et al., 2011) در این مطالعه، در نمونه‌های مربوط به آزمایش رنگ‌آمیزی با نیتروبلوتترازولیوم مشاهده شد که در تیمار شاهد رنگ‌پذیری در همه قسمت‌های جنین به خصوص نوک ریشه‌چه که فعالیت متابولیکی بالایی دارد انجام شده است. با افزایش مدت زمان انبارداری و همچنین افزایش شدت زوال مصنوعی علاوه بر اینکه از شدت رنگ آبی کاسته شده است، مشاهده شد که از نوک ریشه‌چه به تدریج رنگ سفید زمینه‌ای جنین به رنگ زرد تغییر شکل داده که نشان از خسارت زوال به این منطقه می‌باشد، زیرا رنگ آبی حاکی از تولید رادیکال سوپراکسید بوده که نشان‌دهنده فعالیت متابولیک بالا در منطقه رنگ‌گیری شده می‌باشد (Oracz et al., 2011).

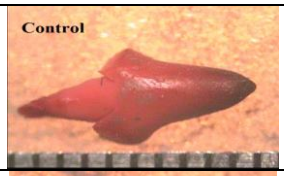
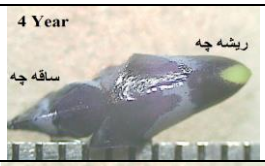
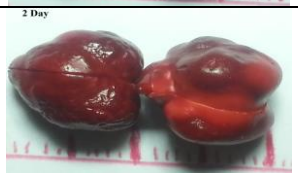
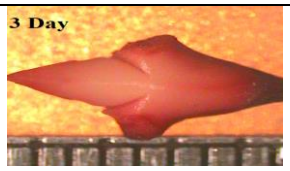
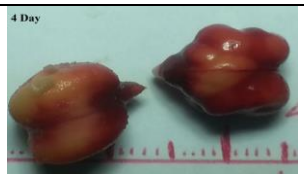
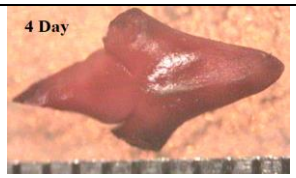
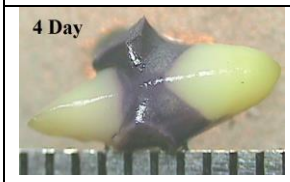
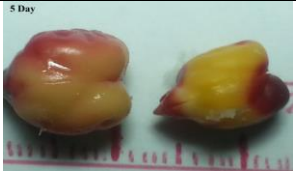
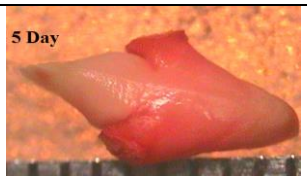
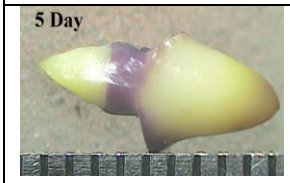
با وجود فعالیت بالا در ناحیه نوک ریشه‌چه انتظار می‌رود رنگ آن آبی تیره گردد ولی خسارت وارد شده به این ناحیه سبب مختل نمودن فعالیت‌های متابولیکی و عدم تولید رادیکال سوپراکسید در این ناحیه شده که حاکی از خسارت به این ناحیه و پیش‌بینی عدم جوانه‌زنی یا جوانه‌زنی ضعیف و تولید گیاهچه غیر نرمال می‌باشد. با افزایش شدت زوال به تدریج از رنگ‌گیری جنین کاسته شده و رنگ زمینه‌ای زرد بیشتر شده است که این وضعیت با کاهش درصد جوانه‌زنی و گیاهچه نرمال و همچنین شاخص قدرت بذر در این آزمایش هم‌خوانی بیشتری دارد (جدول ۲). این درحالی است که در آزمون تترازولیوم نمی‌توان با قاطعیت در مورد کاهش قابلیت حیات بذور و کاهش درصد جوانه‌زنی و تولید گیاهچه نرمال تا تیمار زوال ٤ روز نظر داد.

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه نرمال تحت اثر زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	درصد گیاهچه نرمال	شاخص بنیه بذر
تیمار زوال	۷	۲۵۵٦**	٤۳۷۳**	۳۲٦٤۷۱۸**
خطا	۲٤	۱۷	۳۵	۳۸۲۵٤
CV		۵/۳	۸/۱	۱۰/٦

*و** به‌ترتیب سطوح معنی‌داری پنج و یک درصد

جدول ۲: ارتباط مقایسه‌ای جوانه‌زنی، قدرت بذر و تعداد گیاهچه نرمال بذور نخود با رنگ‌آمیزی بذر و جنین با استفاده از ترازولیوم و نیتروبلوترازولیوم تحت زوال مصنوعی و انبارداری طبیعی.

تیمارها	درصد جوانه‌زنی	درصد گیاهچه نرمال	شاخص بنیه بذر	رنگ آمیزی بذر با ترازولیوم (مقیاس یک میلی‌متر)	رنگ آمیزی جنین با ترازولیوم (مقیاس ۰/۵ میلی‌متر)	رنگ آمیزی جنین با نیتروبلوترازولیوم (مقیاس ۰/۵ میلی‌متر)
شاهد	۹۵^{ab}	۹۵^{a}	۲۶۵٤^{a}			
دو سال	۹٤^{ab}	۹۰^{a}	۲٦٤۲^{a}			
چهارسال	۵۹^{d}	۵۸^{b}	۱٦۰٤^{c}			
یک روز	۹۸^{a}	۸۹^{a}	۲۵۸۸^{a}			
دوروز	۹۱^{b}	۸۲^{a}	۲۵٤۲^{a}			
سه روز	۷٤^{c}	۷۱^{b}	۲۳٦۵^{a}			
چهار روز	۳۷^{e}	۲٤^{c}	۹۰۵^{d}			
پنج روز	۱۹^{f}	٤^{d}	۱۲٦^{e}			

نتیجه‌گیری نهایی

افت درصد جوانه‌زنی و تولید گیاهچه نرمال نتیجه کاهش قدرت و قابلیت حیات توده بذری می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رنگ‌آمیزی جنین توده بذری نخود با نیتروبلوتترازولیوم نسبت به رنگ‌آمیزی با ترازولیوم هم‌خوانی بیشتری با صفاتی از قبیل درصد جوانه‌زنی، درصد گیاهچه نرمال تولیدی و شاخص قدرت بذر داشته و راحت‌تر می‌توان نتایج حاصل از آنرا تفسیر نموده و همچنین قدرت بذر و درصد گیاهچه نرمال تولیدی را بهتر و با دقت بالاتری پیش‌بینی نمود. بنابراین در نهایت می‌توان یک آزمون جدید به نام "آزمون نیتروبلوتترازولیوم" را برای بررسی دقیق‌تر قابلیت حیات بذور و پیش‌بینی و تخمین گیاهچه‌های نرمال تولیدی در فناوری تولید، کنترل و گواهی بذر معرفی نمود که قدرت بالاتری نسبت به آزمون ترازلیوم دارد. مزایای استفاده از این آزمون برای موسسات تولید نهال و بذر و همچنین موسسات کنترل و گواهی بذر و شرکت‌های تولید بذر می‌باشد. این آزمون توسط مولفین در جهت اهداف یاد شده برای اولین بار در دنیا ابداع شده و بخشی از رساله دکتری (Ph.D) نگارنده مسئول در رشته تخصصی علوم و تکنولوژی بذر بوده که در تابستان ۱۳۹۵ به صورت پیشنهادیه جهت ثبت یک روش جدید به نام مولفین برای انجمن بین‌المللی آزمون بذر (ISTA) ارسال و در پایگاه اطلاعاتی این سازمان ثبت شده و در حال حاضر در این سازمان در حال بررسی و ثبت می‌باشد.

References

Akhter, F.N., Kabir, G., Mannan, M.A., and Shaheen, N.N. 1992. Aging effect of wheat and barley seeds upon germination mitotic index and chromosomal damage. J. Islamic Acad. Sci. 5: 44-48.

Aslam, M., Zafar, A., Reshi, T. and Siddiqi, O. 2010. Standardization of seed viability protocol for *pinus wallichiana* a.b.jackson in kashmir, india. Int. J. Pharma. Sci. Rev. Res. 4(3): 93-98.

Azad, F. and Tobe, A. 1992. Relationship of green efficiency of wheat with dry matter production and some other characteristics in laboratory and greenhouse cultivation. 6th Agronomy and Plant Breeding Congress. Pp 233. Babolsar, Iran. (In Persion).

Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14, 93–107.

Demir, I. and Mavi, K. 2008. Controlled deterioration and accelerated aging tests to estimate the relative storage potential of cucurbit seed lots. Hort. Sci. 43: 1544–1548

Dietz, K., Jacquot, J. and Harris, G. 2010. Hubs and bottlenecks in plant molecular signalling networks. New Phytol. 188: 919–938.

Donald, W.W. 1994. A method of validating the Tetrazolium assay for testing viability of dormant jointed Goatgrass (*Aegilops cylindrical*) seed. Weed Sci. 42: 502-508.

Fabrizus, E., Tekrony, D.M., Egli, D.B. and Rucker, M. 1999. Evaluation of a viability model for predicting soybean seed germination during warehouse storage. Crop Sci. 39: 194-201.

Ghaderi-Far, F. and Soltani, A. 2011. Seed testing and certification. Jihad of Mashhad University press. 200p. (In Persian).

Ghaderi-Far, F., Kamkar, B. and Soltani, A. 2012. Seed science and technology (translate). Jihad of Mashhad University press. 200p. (In Persian).

Ghasemigolazani, K., Salehin, M., Rahimzadehkhoee. F. and Moghadam, M. 1994. The effect of seed vigor on emergenceof seedling and grain yield of wheat. J. Agric. Sci. Nat. Resources. 48: 42-54. (In Persian with English abstract).

Harty, R.L., Paleg, L.G. and Aspinall, D. 1972. Quantitative reduction of teriphenyl tetrazolium chloride as a measure of viability in cereal seeds. Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 12: 517-522.

Hosseini, F. 2008. Effect of deterioration on seed germination, establishment and operation of five Rapeseed weather in Ahvaz. Ahvaz University. Ph.D thesis. 180 pp. (In Persian with English abstract).

ISTA. 2003. Working sheets on Tetrazolium testing. Vol 1.

ISTA. 2012. International Rules for Seed Testing, Bassersdorf: International Seed Testing Association.

Lakon, G.C. 1942. Topographicher Nachweis dier kiemfahigkeit der Getriedefruchitee durch Tetrazolium- saize. Beri. Deut. Botan. Gesell. 60:299-305.

Leymarie, J., Vitkauskaite, G., Hoang, H.H., Gendreau, E., Chazoule, V., Meimoun, P., Corbineau, F., El-Maarouf-Bouteau, H. and Bailly, C. 2011. Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of Arabidopsis Seed Dormancy. Plant Cell Physiol. 53(1): 96–106.

Mohsennasab, F., Sharafizadeh, M. and Siadat, A. 2010. Effect of Seed deterioration (accelerated aging) on germination and seedling growth of wheat as in vitro. J. Crop Physiol. 2(7): 87-90. (In Persian with English abstract).

Mollashahi, M., Hosseini, S.M., Bayat, D., Naseri, B., Rezaee, A. and Vatani, L. 2009. Effect of collection time on germination and viability of *Tilia platyphylus* (Basswood). Iranian J. Forest and Poplar Res. 16(3): 478-485.

Nkang, A. and Umoh, E.O. 1997. Six month storability of five soybean cultivars as influenced by stage of harvest, storage temperature and relative humidity. Seed Sci. Tech. 25: 93-99.

Oracz, K., Voegele, A., Tarkowska, D., Jacquemoud, D., Kova, V.T., Urbanova, T., Strnad, M., Sliwinska, E., Leubner-Metzger, G. and Myrigalone, A. 2011. Inhibits Lepidium sativum Seed Germination by Interference with Gibberellin Metabolism and Apoplastic Superoxide Production Required for Embryo Extension Growth and Endosperm Rupture, Plant Cell Physiol. 53(1): 81–95.

Panobianco, M., Vieira, R.D. and Perecin, D. 2007. Electrical conductivity as an indicator of pea seed aging of stored at different temperatures. Scien. Agric. 64:119–124.

Roozrokh, M. and Ghasemigolazani, K. 1998. The impact of the green seed deterioration, yield and yield components of chickpea cultivars under full irrigation and watering restriction. Tabriz University. Ph.D thesis. 142 pp. (In Persian with English abstract).

Soltani, A. and Maddah, V. 2011. Simple Applications for Education and Research in Agriculture. Ecological Society of Iran. 95p.

Soltani, A., Kamkar, B., Galeshi, S. and Akramghaderi, F. 2009. The effect of aging on seed genetic resources, and heterotrophic growth of wheat seedlings. J. Agric. Sci. Nat. Resources. 15(1): 68-76. (In Persian with English abstract).

Tina, X., Song, S. and Lei, Y. 2008. Cell death and reactive oxygen species metabolism during accelerated ageing of soybean axes. Russ. J. Plant Physiol. 55: 33-40.