بهینه سازی دستورالعمل بکارگیری تترازولیوم در راش شرقی

شادی میرزاوندیانی* و وحیده پیام نور

گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده علوم جنگل، گروه جنگل‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۵

چکیده

برای انجام هرگونه کار اصلاحی بر روی بذر، تعیین میزان قابلیت حیات آن از طریق انجام آزمون‌های جوانه‌زنی دارای اهمیت فراوانی است. آزمون‌های بیوشیمیایی به صورت کلی روش‌های سریع‌تری برای ارزیابی زنده بودن نمونه‌های بذری و به طور اختصاصی برای ارزیابی بذرهای غیرقابل جوانه‌زنی که به نظر می‌رسد خواب باشند، از طریق سنجش بافت‌های ضعیف یا مرده ارائه می‌کنند. آزمون تترازولیوم از معمول‌ترین آزمون‌های یادشده است. تحقیق حاضر با هدف بهینه‌سازی شرایط آزمون تترازولیوم شامل غلظت محلول، دما و مدت زمان نگهداری بذور در محلول برای گونه راش شرقی انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. نتایج نشان داد فاکتورهای مورد بررسی باعث ایجاد تغییرات معناداری در درصد رنگ‌پذیری بذور می‌شوند. برای تعیین بهترین شرایط آزمون تترازولیوم نتایج این آزمون با نتایج حاصل از آزمون کشت جنین (در محیط کشتMS) مقایسه شد. تیمار خیس کردن بذور به مدت ۱۸ ساعت و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در محلول ۰/۵ درصد تترازولیوم با بیشترین شباهت به نتایج آزمون کشت جنین، تیمار مناسب برای آزمون جوانه‌زنی با استفاده از محلول تترازولیوم انتخاب شد.

واژه‌های کلیدی: تترازولیوم، راش شرقی، زنده‌مانی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۷۹۱۱۵۱۵۷، پست الکترونیکی:sh.mirzavandian89@yahoo.com

مقدمه

نخستین قدم برای انجام هر گونه کار اصلاحی و همچنین شناسایی خصوصیات بذور ارزیابی قوه نامیه می‌باشد که از طریق انجام آزمون‌های جوانه‌زنی انجام می‌شود (۱). قوه نامیه، درصد یا سهمی از بذور زنده در مقدار معینی نمونه می‌باشد (۲۳) و نشان دهنده درجه زنده بودن بذر، فعالیت متابولیکی و دارا بودن آنزیم‌هایی است که بتوانند واکنش-های متابولیکی لازم برای جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را آنالیز نمایند (۱). اطلاعات حاصل از این آزمایش‌ها در زمینه‌های مختلفی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. روش-های مختلفی برای تخمین قوه نامیه وجود دارد که می‌توان به آزمون جوانه‌زنی، آزمون‌های بیوشیمیایی، روش X-REY و آزمون کشت جنین اشاره نمود. در این میان آزمون‌های بیوشیمیایی روش‌های سریع‌تری برای ارزیابی زنده بودن نمونه‌ها و به طور اختصاصی ارزیابی بذرهای غیرقابل جوانه‌زنی که به نظر می‌رسد خواب باشند، از طریق سنجش بافت‌های ضعیف یا مرده ارائه می‌کنند (۳). آزمون تترازولیوم که از معمول‌ترین آزمون‌های یادشده است و به صورت گسترده برای تشخیص قوه نامیه بذرها استفاده می‌شود، بر اساس واکنش تری فنیل تترازولیوم کلراید با هیدروژن حاصل از فعالیت آنزیم دهیدروژناز در بافت‌های زنده به کار گرفته می‌شود؛ این واکنش سبب می-شود تا رنگیزه‌ای نامحلول در آب به نام فرمازان در سلول-های زنده تشکیل و آنها را از بی‌رنگی به رنگ قرمز درآورد اما سلول‌های غیرزنده به صورت بی‌رنگ باقی می‌مانند (۷، ۱۵). ISTA (2003) الگوهایی از رنگ‌پذیری جنین را برای تعدادی از بذور جنگلی منتشر کرده است. به صورت

پراکنده مطالعاتی نیز در مورد گونه‌هایی که در لیست فوق قرار ندارند توسط محققان مختلف انجام شده و در ژورنالهای مرجع مربوط به ایستا معرفی شده است که می‌توان به چند مورد اشاره کرد؛ به طور مثال، Kak *et al.*, (2008) اعلام کردند که تغییر میزان غلظت، دما و زمان‌های مختلف باعث بوجود آمدن میزان رنگ‌پذیری متفاوتی در بذور گونه *Jatropa curcas* می‌شود، در این تحقیق شرایط اپتیمم برای آزمون خیس کردن بذور، در غلظت ۰/۱ درصد محلول تترازولیوم به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و یا خیس کردن در غلظت ۰/۲۵ درصد به مدت ۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد معرفی شد. مشابه همین نتایج را Gupta *et al*,. (2010) برای گونه *Baliospermum muntanum* به دست آوردند، بیشترین رنگ‌پذیری در غلظت ۰/۰۲۵٪ با دمای آزمایش ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان خیس کردن در محلول به مدت ۱۷ ساعت مشاهده شد و کمترین میزان رنگ‌پذیری نیز در غلظت ۰/۰۵، دمای ۲۰ درجه و زمان ۴ ساعت اتفاق افتاد. راش شرقی *Fagus orientalis* متعلق به خانواده *Fagaceae*، از درختان پهن برگ با ارزش است (۴). تجدید نسل آن از طریق بذر انجام می‌شود. بذر راش فاقد اندوسپرم با خواب نسبتاً طولانی مربوط به پوسته است که تاکنون موجب مشکلاتی در بازده جوانه‌زنی شده است (۲۸، ۲۴، ۵). مطالعات هیستوشیمی (۲۷) و تکنیک‌های عملی (۹) حضور فنول در پوسته بذر این گونه و نقش آن در جلوگیری از جوانه‌زنی را نشان می‌دهند (۱۱). پوسته و تستا می‌توانند به وسیله مکانیسم‌های مختلفی از قبیل مصرف اکسیژن و جلوگیری از تبادل گازها (۲۶، ۱۲)، جذب آب (۲۶، ۱۹)، نفوذ نور، خروج مهارکننده‌های رشد از جنین (۲۶، ۱۰) و ممانعت از رشد آن مانع جوانه‌زنی شوند (۲۶، ۲۲). راش شرقی در چرخه توالی و تکامل جنگل‌های شمال کشور نقش بسیار مهمی دارد، به عنوان یکی از گونه‌های اصلی کلیماکس در دامنه‌های ارتفاعی ۲۰۰۰-۷۰۰ متر از سطح دریا به حساب می‌آید و عمده-ترین مساحت این جنگل‌ها را تشکیل می‌دهد، به طوری که در حدود ۳۰٪ حجم و ۲۴٪ تعداد در هکتار را به خود اختصاص داده است (۶). به علت نقش مهمی که در ترکیب و ساختار اکوسیستم های جنگل‌های خزری بازی می‌کند تحقیقات زیادی انجام شده و در نتیجه بدست آوردن شرایط اپتیمم برای ارزیابی سریع قوه‌نامیه بذور آن در آزماشگاه اهمیت فراوان دارد. ISTA شرایط اپتیمم آزمون تترازولیوم را برای جنس راش، ۱۸ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱ درصد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد معرفی کرده است. این تحقیق با هدف ارائه طرحی برای ارزیابی قوه نامیه بذور راش شرقی با استفاده از آزمون تترازولیوم و با توجه به عدم وجود پروتکل مربوطه برای این گونه در لیست ISTA (2003)، شکل گرفته است. از آنجایی که بر اساس تحقیقات انجام شده میزان خواب بذر و در نتیجه تیمار مناسب جهت شکست آن در مبدأ و در سال‌های مختلف بذردهی، متفاوت است (۲۰، ۱۳، ۹) و در مورد بذور با مبدأ این آزمایش تحقیقی انجام نشده و همچنین خواب راش شرقی مربوط به پوسته آن بوده، در نتیجه جهت حصول اطمینان، از آزمون کشت جنین برای مقایسه با نتایج آزمون تترازولیوم استفاده گردید.

مواد و روشها

بذور مورد مطالعه از درختان راش در منطقه شصت‌کلاته گرگان واقع در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۴ درجه و ۲۰ دقیقه شرقی در سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری و ب عدبه آزمایشگاه منتقل شدند. از توده بذر نمونه‌هایی انتخاب و با مخلوط کردن آنها یک نمونه معرف تهیه شد (۱۶). برای تهیه محلول بافر ۱۴/۷۱ گرم K_2Po_4 را در ۱۶۲۰ و ۲۲/۹۱ گرم Na_2HPo_4 را در ۲۴۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و بعد با هم مخلوط شد (PH= ۷). در مرحله بعد برای تهیه محلول ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد تترازولیوم به ترتیب به میزان ۶/۷۵،

۱۳/۵ و ۲۰/۲۵ گرم نمک تترازولیوم کلراید هریک را جداگانه در ۱۳۵۰ میلی‌لیتر از محلول بافر ریخته و حل شد. پریکارپ بذور (پوسته بذور) به وسیله اسکالپل و پنس جدا و بلافاصله در آب مقطر با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد معلق شدند. پس از گذشت ۱۸ ساعت تستا جدا و در محلول تترازولیوم با PH = ۷ معلق شدند (۱۵). آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵۰ عدد بذر) انجام شد. غلظت‌های مختلف محلول تترازولیوم، مدت زمان معلق ماندن در محلول (۱۵، ۱۸ و ۲۴ ساعت) و دمای قرارگیری محلول حاوی بذور (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان معین بذور از محلول خارج و با آب مقطر شستشو و مورد بررسی قرار گرفتند. پس از بررسی به طور کلی ۴ الگوی رنگ-پذیری در بذور مورد مطالعه شناسایی شد (شکل ۱):

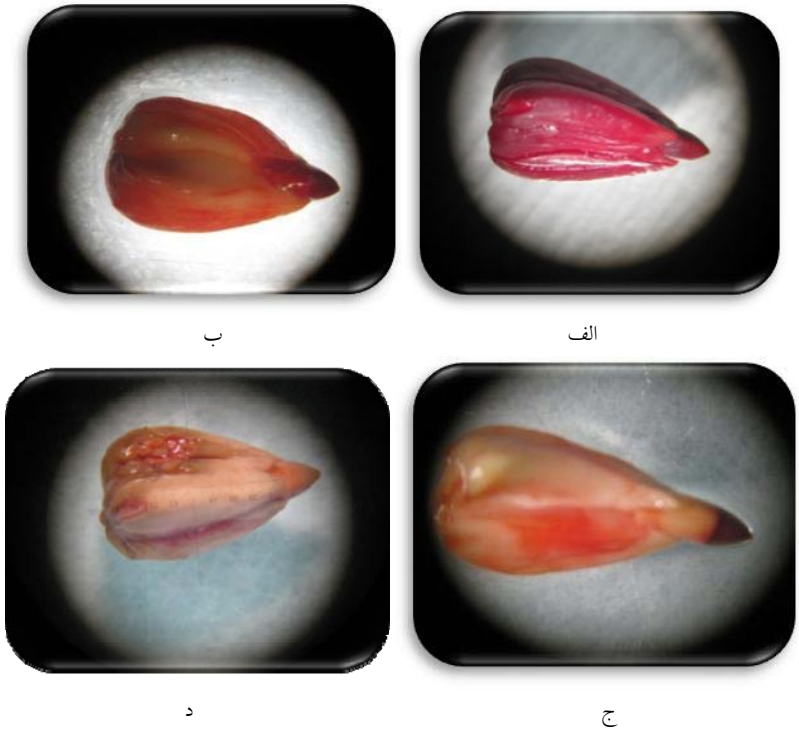
۱. بذوری که به‌طور کامل و یکنواخت رنگ شده‌اند.

۲. بذوری که محور جنینی و قسمت بیشتر لپه‌ها رنگ گرفته است.

۳. بذوری که محور جنینی رنگ نگرفته و دارای بافت-های مرده هستند اما قسمت‌هایی از لپه‌ها رنگ گرفته است.

۴. بذوری که کاملاً بی‌رنگ هستند.

برای ارزیابی میزان زنده‌مانی، دسته اول و دوم به عنوان بذور زنده و دو دسته دیگر به عنوان بذور غیر زنده در نظر گرفته شدند (۱۸، ۱۴).



شکل ۱- الگوی رنگ‌پذیری در بذور *Fagus orientalis*. الف) رنگ‌پذیری کامل و یکنواخت بذور، ب) رنگ‌پذیری محور جنینی و قسمت بیشتر لپه‌ها، ج) رنگ‌پذیری قسمت‌هایی از لپه‌ها (محور جنینی رنگ نگرفته و دارای بافت‌های مرده هستند)، د) عدم رنگ‌پذیری

در آزمون کشت جنین که برای تعیین قوه نامیه بذور استفاده می شود، جنین بذرها خارج و کشت داده شده و میزان جوانه‌زنی محاسبه می‌شود. برای انجام آزمون محیط کشت MS فاقد هورمون‌های رشد گیاهی و دارای ۳ درصد ساکارز آماده و PH محیط برابر ۵/۷ تنظیم گردید (۵). به منظور سترون سازی، محیط کشت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. بذور طی یک روش ۴ مرحله‌ای (۱- قرار دادن بذرها به مدت ۱۰ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، ۲- شستشو با آب‌مقطر سترون ۵ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه، ۳- استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه، ۴- شستشو با آب‌مقطر سترون ۵ بار هر بار به مدت ۵ دقیقه) سترون شدند. لایه اندوکارپ بذور و بعد تستا حذف و در ژرمیناتور با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۵۰۰۰-۴۵۰۰ لوکس و با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت گردیدند. این آزمون به صورت کاملاً تصادفی با ۳ تکرار (هر تکرار شامل ۵۰ عدد بذر) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم افزار Spss 16.0 انجام و میزان تأثیر هریک از شرایط ذکر شده آزمون به تنهایی و اثر متقابل آنها بر درصد رنگ‌پذیری تعیین گردید. برای تعیین بهترین شرایط آزمون، تیماری که میزان رنگ‌پذیری نزدیکتری با مقدار به دست آمده از آزمون کشت جنین داشت با استفاده از آزمون دانکن انتخاب شد.

نتایج

بر اساس نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های رنگ‌پذیری بذور مشخص شد. اثرات اصلی و متقابل تیمارهای اعمال شده اختلاف معناداری در سطح ۹۹٪ داشته ولی اثر سه جانبه تیمارها، تأثیر معناداری بر میزان رنگ‌پذیری بذور نداشته است (جدول ۱).

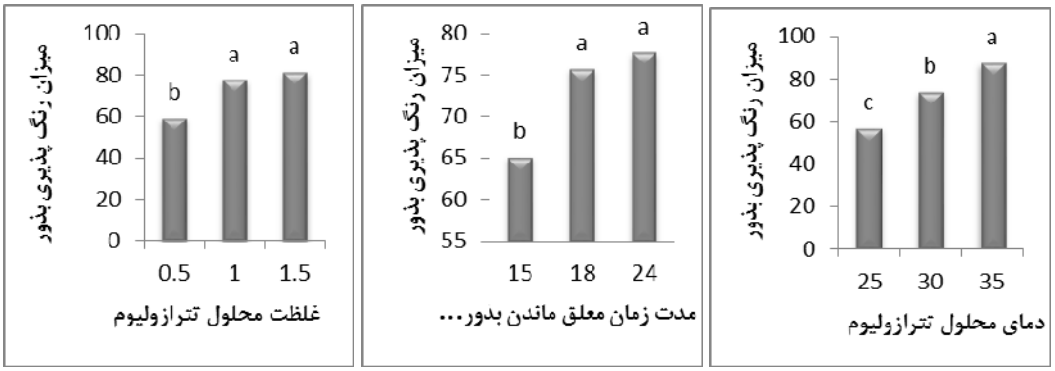
جدول۱-نتایج تجزیه واریانس حاصل از اثرات اصلی و متقابل شرایط آزمون تترازولیوم

منابع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	مقدار معناداری
غلظت	۷۴۷۳/۷۲	۲	۳۷۳۶/۸۶	۳۹/۸۳	۰/۰۰۰**
دما	۱۲۷۰۸/۴۵	۲	۶۳۵۴/۲۲	۶۷/۷۲	۰/۰۰۰**
زمان	۲۴۷۶/۸۲	۲	۱۲۳۸/۴۰	۱۳/۲	۰/۰۰۰**
غلظت×دما	۳۴۷۲/۰۳	۴	۸۶۸/۰۰	۹/۲۵	۰/۰۰۰**
غلظت×زمان	۲۳۲۶/۸۱	۴	۵۸۱/۷۰	۶/۲	۰/۰۰۰**
دما×زمان	۴۷۲۶/۵۰	۴	۱۱۸۱/۶۲	۱۲/۶	۰/۰۰۰**
غلطت×دما×زمان	۵۳۴/۵۵	۸	۶۶/۸۲	۰/۷۱	۰/۶۸ns
خطای آزمایشی	۵۰۶۶/۷۰	۵۴	۹۳/۸۳		
کل	۳۸۷۸۵/۰۲	۸۱			

Ns و **: به ترتیب بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد می‌باشند.

مقایسات میانگین فاکتورهای مختلف این آزمون نشان داد مقادیر بالای این فاکتورها باعث ایجاد رنگ‌پذیری بیشتری در بذور شدند. در این مقایسات غلظت‌های ۱ و ۱/۵٪ با ایجاد بیشترین رنگ‌پذیری در بذور به طور مشترک در یک دسته (a) قرار گرفتند و دارای تفاوت معناداری در میزان رنگ‌پذیری نسبت به غلظت ۰/۵٪ (b) بودند. مقایسات میانگین فاکتور دما مشخص کرد که بین هر سه گروه در سطح احتمال ۹۹ درصد اختلافات معناداری وجود دارد. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با بیشترین میزان رنگ‌پذیری در دسته اول (a) و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با کمترین میزان

رنگ‌پذیری در دسته سوم (c) قرار گرفتند. غلظت و دماهای بالاتر علاوه بر افزایش میزان رنگ‌پذیری باعث ایجاد رنگ تیره‌تری در بذور نیز شدند. زمان‌های ۱۸ و ۲۴ ساعت نیز با بیشترین میزان رنگ‌پذیری به طور مشترک در یک گروه (a) و زمان ۱۵ ساعت با کمترین میزان رنگ-پذیری در گروه دیگری (b) قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف محلول تترازولیوم، مدت زمان معلق ماندن بذور در محلول و دمای محلول بر میزان رنگ‌پذیری

نتایج، حاکی از تفاوت قابل توجه در میزان رنگ‌پذیری بذور تحت تیمارهای مختلف آزمون بود (جدول ۲). بیشترین میزان رنگ‌پذیری در تیمار ۱۵ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱٪ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، به میزان ۹۷/۷۷٪ و پس از آن در تیمارهای ۲۴ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱/۵٪ در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۱۸ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱٪ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۴ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱٪ در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با رنگ‌پذیری برای هر ۳ تیمار به میزان ۹۵/۵۵٪ دیده شد. کمترین میزان رنگ‌پذیری نیز در تیمار ۱۵ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۰/۵٪ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۱۵/۵۵٪ و پس از آن در تیمار ۱۵ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱٪ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۳۵/۵۵٪ مشاهده شد.

جدول ۲- تأثیر شرایط آزمون (مدت زمان معلق ماندن، غلظت و دمای محلول تترازولیوم) بر میزان رنگ‌پذیری بذور Fagus orientalis L. و مقایسه با نتایج کشت جنین

زمان	غلظت تترازولیوم	۲۵ درجه سانتی‌گراد	۳۰ درجه سانتی‌گراد	۳۵ درجه سانتی‌گراد
۱۵ ساعت	۰/۵	۱۵/۵۵^{i}	۵۳/۳۳^{ij}	۹۳/۳۳^{abc}
	۱	۳۵/۵۵^{k}	۵۷/۷۷^{hi}	۹۷/۷۷^{a}
	۱/۵	۶۰^{ghi}	۸۴/۴۴^{abcdef}	۸۸/۸۹^{abcd}
۱۸ ساعت	۰/۵	۵۷/۷۸^{hi}	۶۸/۸۹^{efghi}	۷۷/۷۷^{bcdefg}
	۱	۷۹/۹۹^{abcdef}	۸۸/۸۹^{abcd}	۹۵/۵۵^{ab}
	۱/۵	۷۳/۳۳^{defgh}	۸۲/۲۲^{abcdef}	۷۵/۵۵^{cdefgh}
۲۴ ساعت	۰/۵	۳۷/۷۷^{jk}	۵۳/۳۳^{ij}	۷۷/۷۷^{bcdefg}
	۱	۶۶/۶۶^{fghi}	۸۲/۲۲^{abcdef}	۹۵/۵۵^{ab}
	۱/۵	۸۶/۶۶^{abcde}	۹۵/۵۵^{ab}	۸۶/۶۷^{abcde}
کشت جنین		۶۸/۹۲^{efgh}		

۱۰ تا ۱۲ روز پس از کشت جنین در محیط کشت MS، لپه اکثر جنین‌ها متورم شده و به رنگ سبز درآمدند و همزمان شروع به بازشدن کردند، ریشه‌چه و محور زیر لپه از بین آنها نمایان شدند. با اینکه اکثر نمونه‌ها دچار آلودگی شدند اما گیاهچه‌ها کاملا مشهود و دارای برگچه شدند (شکل ۳).

شکل ۳- گیاهچه‌های حاصل از کشت جنین در محیط کشت MS

در این بین تعدادی از بذور به علت عدم توانایی در جوانه-زنی به رنگ قهوه‌ای درآمده و پوسیده شدند. در آخر جوانه‌زنی بذور ۶۸/۹۲٪ تعیین شد.

بحث

آزمون‌های تعیین و تشخیص بنیه بذر اهمیت ویژه‌ای در اجرای آزمایش‌های مختلف مرتبط با بذر دارند. با وجودی که هیچ آزمونی به طور جامع نتوانسته جایگزین آزمایش استاندارد جوانه‌زنی بذر شود (۲) ولی آزمون های دیگری که به مدت زمان کمتری برای اجرا نیاز دارند طراحی شده و به وفور استفاده می‌شوند. آزمون تترازولیوم یکی از سریع‌ترین روش‌ها در این خصوص بوده و بیشتر زمانی که جوانه‌زدن با کاهش جوانه‌زنی به علت رکود بذر است مورد استفاده قرار می‌گیرد. بهینه سازی شرایط این آزمون در به دست آوردن نتایج دقیق‌تر اهمیت دارد. شرایط دور از حد اپتیمم آزمون باعث ایجاد خطا در درک میزان رنگ-پذیری می‌شوند؛ در رنگ‌پذیری‌های بسیار تیره امکان اشتباه در درک تفاوت بین بخش‌های زنده بذور از بخش-های آسیب دیده مکانیکی وجود دارد، رنگ‌پذیری خیلی روشن هم ممکن است منجر به اشتباه در مورد درک تفاوت بین بعضی از بذور زنده و غیر زنده شود (۲۰). از طرفی قیمت بالای نمک تترازولیوم لزوم استفاده از آن را به میزان حداقل مورد نیاز کاملا توجیه می‌کند. برای بهینه سازی شرایط آزمون سه عامل دما، غلظت و مدت زمان قرارگیری بذور در محلول، مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد رنگ‌پذیری بذور تحت تأثیر عوامل فوق، متفاوت و در مقادیر بالا بیشتر می‌شود که با نتایج Kak *et al*,. (2009) و Gupta *et al*,. (2010) مطابقت دارد. ایستا (۲۰۰۳) شرایط اپتیمم آزمون تترازولیوم را برای خانواده راش، ۱۸ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۱ درصد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد معرفی کرده است، شرایط ذکر شده به صورت کلی بوده و هر دو جنس بلوط و راش را که در کشورمان وجود دارند دربر می‌گیرد. بهتر است میزان اپتیمم این پارامترها برای گونه‌های مختلف بخصوص بومی کشور که در لیست ایستا نیامده‌اند مشخص و با اطمینان بیشتری به کار گرفته شوند. طبق نتایج حاصل میزان قوه‌نامیه حاصل از کشت جنین بذرو راش شرقی ۶۸/۸۹٪ تشخیص داده شد. از تیمارهای مورد بررسی تیمار ۱۸ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۰/۵٪، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد (با میزان رنگ‌پذیری ۶۸/۸۹٪) بیشترین شباهت را به نتایج مربوط به کشت جنین داشته، از این‌رو مناسب‌ترین تیمار برای انجام آزمون قوه نامیه بذر این گونه تشخیص داده شد. با وجود اینکه حداکثر رنگ‌پذیری در تیمارهای با غلظت‌های بالای

تترازولیوم و همچنین دمای آزمایش بالاتر حاصل شده‌اند، بنابراین نمی‌توانند به عنوان بهترین معرفی شوند، زیرا توجه به حداکثر رنگ‌پذیری به تنهایی و بدون مقایسه با سایر آزمون‌های تعیین قوه نامیه نمی‌تواند معیار مناسبی برای انتخاب باشد. به این ترتیب برای انجام آزمون قوه-نامیه بذور راش شرقی ۱۸ ساعت خیس کردن در محلول تترازولیوم ۰/۵٪، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد توصیه می‌گردد. امید است نتایج این تحقیق بتواند برای اصلاح-گرانی که برای انجام تحقیقات خود نیاز به آزمایش‌های جوانه‌زنی در مورد گونه راش شرقی را دارند، مؤثر واقع شود.

منابع

۱. اکرم قادری، ف.، کامکار، ب و سلطانی، ا.، (مترجمان)، ۱۳۸۷. علوم و تکنولوژی بذر، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۵۱۲ ص.

۲. تاج بخش، م و قیاسی، م.، ۱۳۸۷. اکولوژی بذر، انتشارات جهاد دانشگاهی آذربایجان غربی، ۱۳۴ ص.

۳. توکل افشاری، ر.، عباسی سورکی، ع و قاسمی، ا.، (مترجمان)، ۱۳۸۷. فناوری بذر و مبانی زیست‌شناختی آن، انتشارات دانشگاه تهران. ۵۱۶ ص.

۴. ثابتی، ح.، ۱۳۷۴. جنگل‌ها، درختان و درختچه‌های ایران، انتشارات دانشگاه یزد، ۷۵۰ ص.

۵. جعفری مفیدآبادی، ع و امانی، م.، ۱۳۸۳. استفاده از روش کشت جنین در شکست خواب بذر راش، فصلنامه پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، (۳): ۲۶۴-۲۵۷.

۶. رسانه، ی.، مشتاق، م.ح و صالحی، پ.، ۱۳۸۰. بررسی کمی و کیفی جنگل‌های کشور، در مجموعه مقالات همایش ملی مدیریت جنگل‌های شمال کشور و توسعه پایدار، تهران، ۸۱-۵۶.

۷. قاسمی گلعذانی، ک و دلیل، ب.،۱۳۹۰. آزمون‌های جوانه‌زنی و قدرت بذر، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، شماره ۴۲۵، مشهد، ۱۰۴ ص.

8. Ann, 1993. Rules for testing seeds. Seed science and technology Jornal, 16(3): 1-11.

9. Bhattacharyya, S., Das B., Ghose, T.K. & Bhattacharya, S. 1999. Investigation on seed germination of Nyctanthes arbor-tristis (Oleaceae) in relation to the total phenol content. Seed science and technology. 27: 321-327.

10. Bewley, J. D. & Black, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Plenum Press, USA.

11. Chow, Y.J. & Lin, C.H. 1991. p-Hydroxybenzoic acid as the major phenolic germination inhibitor of papaya seed. Seed science and technology 19: 167-174.

12. Corbineau, F. & Côme, D. 1995. Control of seed germination and dormancy by the gaseous environment. In: Kigel, J.; Galili, G. (eds.) Seed development and germination. Marcel Dekker, USA. 399–423.

13. Derkx, M.P.M. and Joustra, M.K., 1997. Dormancy breaking and short-term storage of pretreated Fagus sylvatica seeds. 269-278: In: Ellis, R.H., Basic Black, M., Murdoch, A.J and Hong, T.D., (Eds.) basic applied aspects of seed biology, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.

14. Gupta, A., V. Gupta, A. Goyal, A. Kak & C, Pandey, 2010. Standardization of the tetrazolium test in Baliospermum montanum (Willd.) Muell.-Arg, Seed science and technology Jornal, 38(4):513-516.

15. ISTA, 2003. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Working sheets on tetrazolium testing, Seed science and technology, 2:149 pp.

16. ISTA, 1999. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing, Seed science and technology Jornal, 27, supplement.

17. ISTA, 1985. International Seed Testing Association. International rules for seed testing, Seed Science and Technology Jornal, 13: 356-513.

18. Kak, A., C. Pandey & V. Gupta, 2009. Assessment of viability of Jatropha curcas L. seeds using the tetrazolium test, Seed science and technology Jornal, 37 (2): 512-515(4).

19. Kelly, K. M., Van Staden, J. & Bell, W. E. 1992. Seed coat structure and dormancy. Plant growth regulation, 11: 201-209.

20. Motallebi, S.A., Tabari, M., Soltani, A. and Etemad,V., 2010. Seed viability of Fagus orientalis Lipsky during short-time storing. Iranian Journal of Forest and Poplar Research. 18 (4): 587-595.

21. Murugesan, P., K. Vanangamudi & R. Umarani, 2002. Evaluation of viability of Oil palm (Elaeis guineensis JACQ.) seeds by tetrazolium test and comparison with germination and in vitro culture results, in Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV, India, 246-250.

22. Prasad, P. & Nautiyal, A. R. 1996. Physiology of germination in Bauhinia: involvement of seed coat in inhibition of germination in B. racemosa Lam. seeds. Seed science and technology. 24: 305-308.

23. Sawma, J.T & C.L. Mohler, 2002. Evaluating Seed Viability by an Unimbibed Seed Crush Test in Comparison with the Tetrazolium Test, Weed Technology Jornal, 16:781–786.

24. Shen, T.Y & P.C. Oden, 2002. Relationships between seed vigour and fumarase activity in Picea abies, Pinus contorta, Betula pendula and Fagus sylvatica, Seed science and technology Jornal, 30:177-186.

25. Suszka, B., Muller,C. and Bonnet-Masimbert, M., 1996. Seeds of Forest Broadleaves- From Harvest to Sowing (translated by Gordon, A.) INRA Editions, Paris.

26. Taylorson, R. B. & Hendricks, S. B. 1977. Dormancy in seeds Annual review of plant physiology, 28: 331-354.

27. Thompson, D. I., Edwards, T. J. & Stader, J. V. 2001. In vitro germination of several Sought African summer rainfall Disa (Orchidaceae) species: is seed testa structure a function of habitat and a determinant of germinability? Systematics and geography of plants, 71: 597-606.

28. Thomsen, K. A. 1997. The Effect of Harvest Time and Drying on Dormancy and Storability in Beechnuts, Basic and applied aspects of seed biology, Current plant Science and Biotechnology in Agriculture jornal, 30: 45-51.

Standardization of the Tetrazolium test in East Beech

Mirzavandiani Sh. and Payam Noor V.

College of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. of Iran

Abstract

To perform any breeding work on seed, determination of its life ability amount via germination test is very important. In general, biotechnical tests present rapid methods for evaluating viability of seed samples and specificalty to assess non-germinable seeds which seems to be dormant through the measurement of weak or dead tissue. Tetrazolium test is the most common of these tests. This study aims to optimize Tetrazolium test conditions including concentration, temperature and storage time on seeds in *Fagus orientalis*. Factorial experiment was conducted in completely randomized design in three replications. the results of this experiment was compared with the obtained results from embryo culture test (in MS medium) for evaluating the best condition of tetrazolium. Soaking treatment of seeds for 18 h at 30°C in a solution of 0/5% Tetrazolium test results with the greatest similarity to embryos cultured was selected as suitable treatment for germination test using tetrazolium protocol in *Fagus orientalis*.

Key words: Tetrazolium, *Fagus orientalis*, Viability, Seed