Iranian Journal of Weed Science
Vol 18, No 2, 2022 (65-73)
DOI: 10.22034/IJWS.2022.127707.1407

مجله دانش علف‌های‌هرز
دورهٔ ۱۸، شمارهٔ ۲، ۱۴۰۱ (ص ۷۳-۶۵)

Image processing for seed stainability detection through tetrazolium test

Mohammad Hosein Zamani*[1], Ali Joumi[1], Eshagh Keshtkar[2], Ali Reza Mahdavian[3] and Hamidreza Sasanfar[4]

1, 2. Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University,Tehran, Iran.
3. Department of Agricultural Machinery Engineering, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares,Tehran, Iran.
4- Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

(Received: December 26, 2022 - Accepted: February 8, 2023)

ABSTRACT

To evaluate the application of the image processing method (RGB and Lab methods) compared to the visual evaluation method for determining the seed viability or stainability of wheat (*Triticum aestivum*) and hairy vetch (*Vicia villosa*) using tetrazolium test, a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications was conducted in the laboratory of Department of Mechanical and Biosystems Engineering of the Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University in 2019. The experimental factors included methods for determining seed stainability (visual assessment**,** RGB, and Lab methods), two plant species (wheat and winter vetch), physical stratification (cross cutting, longitudinal cutting, sanding, needling, and control), and duration of exposure to tetrazolium (10 and 24 hours). The results showed that the stainability of seeds exposed to tetrazolium for 24 hours was higher than those exposed for 10 hours. The highest stainability of seeds was observed in the longitudinal cutting treatment for both wheat and hairy vetch species in the all three determining seed stainability methods. The RGB and Lab methods showed the highest stainability percentage for wheat and hairy vetch seeds, respectively, where the seeds were cut longitudinally. Therefore, the RGB and Lab image processing technique can be used as a fast, precise, and new method for determining the seed viability of crops and weeds through the tetrazolium test.

Keywords: Hairy vetch, Lab method, RGB method, seeds stratification, wheat.

کاربرد پردازش تصویر در تشخیص درصد رنگ‌پذیری بذر با آزمون تترازولیوم

محمدحسین زمانی[۱]، علی جومی[۱]، اسحاق کشتکار*[۲]، علیرضا مهدویان[۳]، حمیدرضا ساسان‌فر[٤]

۱ و ۲- دانش آموخته و استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ۳- استادیار، گروه مکانیک ماشین‌های کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، ٤- استادیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران.

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۱۰/۵- تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۱/۱۹)

چکیده

به‌منظور ارزیابی کاربرد پردازش تصویر (استفاده از دو روش RGB و Lab) در مقایسه با روش ارزیابی چشمی در تعیین درصد قوه‌نامیه گندم (*Triticum aestivum*) و ماشک گل‌خوشه‌ای (*Vicia villosa*) با استفاده از آزمون تترازولیوم یک درصد، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه گروه مکانیک بیوسیستم دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. فاکتورهای این آزمایش شامل روش‌های تشخیص رنگ‌پذیری (روش چشمی، RGB و Lab)، دو گیاه گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای)، خراش‌دهی فیزیکی (برش‌عرضی، برش‌طولی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد بدون تیمار فیزیکی) و مدت زمان قرارگیری در تترازولیوم (۱۰ و ۲۴ ساعت) بودند. نتایج نشان داد که رنگ‌پذیری بذرها در تیمار ۲۴ ساعت قرارگیری در محلول تترازولیوم، بیشتر از تیمار ۱۰ ساعت بود. برش طولی بذر گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای، رنگ‌پذیری را در مقایسه با سایر تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی در هر سه روش ارزیابی افزایش داد. کاربرد روش‌های RGB و Lab درصد رنگ‌پذیری بالاتری را به‌ترتیب برای بذرهای گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای با برش طولی نشان دادند. بنابراین، فن‌آوری پردازش تصویر به روش RGB و Lab می‌تواند به‌عنوان یک روش سریع، دقیق و جدید برای تعیین قابلیت زنده‌مانی بذرهای گیاهان زراعی و علف‌های‌هرز از طریق آزمون تترازولیوم مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: خراش‌دهی بذر، روش Lab، روشRGB ، زنده‌مانی، گندم، ماشک گل‌خوشه‌ای

* Corresponding author E-mail: keshtkar@modares.ac.ir

مقدمه

تعیین قوه‌نامیه بذر، یکی از مهم‌ترین اقدامات برای بررسی ویژگی‌های بذر به‌ویژه قابلیت جوانه‌زنی می‌باشد. آزمون‌های جوانه‌زنی و بیوشیمیایی، کشت‌جنین و استفاده از اشعه ایکس، از روش‌هایی هستند که به‌برای سنجش توانایی زنده‌مانی بذرها استفاده می‌شود (Van Mourik, 2003) و از بین این روش‌ها، آزمون‌های بیوشیمیایی یکی از سریع‌ترین روش‌ها برای تعیین قوه‌نامیه بذر است (Van Mourik, 2003). آزمون تترازولیوم (Tetrazolium test) به‌عنوان یک روش بیوشیمیایی برای کنترل کیفیت بذر گونه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به‌صورت گسترده، برای تشخیص قوه نامیه بذر استفاده می‌شود (ISTA, 2003). این آزمون در اوایل دهه ۱۹٤۰ در آلمان توسعه یافت و سپس در ایالات متحده پس از جنگ جهانی دوم معرفی شد (Vankus, 1997). یکی از دلایل استفاده گسترده از این آزمون، سرعت انجام آن (چند ساعت) در تعیین میزان قابلیت زنده‌مانی بذر است. سازوکار انجام آزمون تترازولیوم بدین صورت است که به هنگام تنفس بافت زنده بذر، نمک تتررازولیوم کلرید یا برومید بی‌رنگ به تری‌فنیل‌فورمازان قرمز رنگ تغییر می‌یابد که این عمل از طریق آزاد شدن یون هیدروژن در اثر فعالیت آنزیم دی‌هیدروژناز صورت می‌گیرد که سبب احیای (کاهش) نمک بی‌رنگ تترازولیوم و تبدیل آن به فورمازان قرمزرنگ می‌شود؛ به عبارتی دیگر، این واکنش، رنگیزه‌های نامحلول در آب با نام فرمازان را که در سلول‌های زنده تشکیل شده‌اند را از حالت بی‌رنگ خارج می‌کند و به رنگ قرمز درمی‌آورد، اما سلول‌های مرده به همان حالت بی‌رنگ باقی می‌مانند و تغییری در آن‌ها مشاهده نمی‌شود و بدین ترتیب، بذر زنده از بذر مرده متمایز می‌شوند (Vankus, 1997). چنانچه جنین و احتمالاً آندوسپرم یا مواد ثانویه ذخیره شده یا باقی‌مانده به‌طور فعال تنفس‌کنند، فرمازان موجود خواهد بود و بافت‌ها رنگ پایدار قرمز به خود می‌گیرند (Vankus, 1997). بر این اساس، قوه‌نامیه بذر از طریق ارزیابی مقدار ناحیه رنگ‌آمیزی شده و شدت آن تعیین می‌شود.

گرچه انجام آزمون تترازولیوم نسبت به سایر آزمون‌های تشخیص قوه‌نامیه، دقیق‌تر و نیازمند زمان کم‌تری می‌باشد، اما چنانچه حجم نمونه‌های مورد آزمون بسیار زیاد باشد، یک آزمون زمان‌بر به‌شمار می‌آید و به تخصص و تجربه بالا در تفسیر میزان رنگ‌پذیری و تعیین درصد قوه‌نامیه بذرها نیاز دارد. بدین دلیل در بسیاری از موارد، عدم مهارت کافی در تفسیر میزان رنگ‌پذیری و احتمال وقوع خطا در میزان شمارش تعداد بذرهای تیمار شده می‌تواند سبب بروز خطا در انجام این آزمون شود (Vankus, 1997). در سال‌های اخیر، روش‌های مبتنی بر ارزیابی رایانه‌ای با بهره‌گیری از تصاویر گرفته شده از بذرها به‌منظور تعیین قوه‌نامیه بذرها در آزمایش جوانه‌زنی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Marcos-Filho *et al*., 2006). طبق گزارش گومزجونیور و همکاران (Gomes-Junior *et al*., 2009) نتایج و بررسی تصایر با استفاده از رایانه در مقایسه با روش‌های مرسوم تعیین قوه‌نامیه بذر ساده‌تر به‌نظر می‌رسد.

کاربرد فن‌آوری‌های جدید از جمله روش پردازش تصویر می‌تواند منجر به کاهش خطا در تجزیه و تحلیل نتایج شود. بهتاری و همکاران (Behtari *et al*., 2014) گزارش کردند که استفاده از سیستم پردازش تصویر با روش RGB به‌منظور تعیین قوه‌نامیه در دو گونه یونجه (*Medicago sativa* L.) و اسپرس (*Onobrychis viciifolia* L.)، یک روش عملی و

دقیق به‌منظور تعیین کیفیت یا قوه‌نامیه بذر در این گیاهان است و می‌تواند برای بسیاری از گیاهان نیز مورد استفاده قرار گیرد، به‌طوری‌که براساس نتایج این پژوهش، روش RGB می‌تواند خیلی دقیق‌تر و آسان‌تر از روش مشاهده چشمی، بذرهای دارای قوه‌نامیه و بدون قوه‌نامیه دو گونه فوق را از هم تشخیص دهد. نتایج بررسی قوه‌نامیه بذر گیاه کاهو (*Lactuca sativa* L.) با پردازش تصویر و ارزیابی با روش RGB نشان داد که بذرهایی که پوسته روشن و اندازه کوچکی دارند، در مقایسه با بذرهای درشت و رنگ پوسته تیره‌تر، درصد قوه‌نامیه یا رنگ‌پذیری کمتری دارند (Peñaloza *et al*., 2005).

یکی از مشکلات آزمون ترازولیوم در روش‌های معمول برای تعیین میزان زنده‌مانی بذر، وابستگی کامل این روش‌ها به تشخیص فرد خبره است؛ بنابراین، این آزمایش با هدف ارزیابی توانایی روش پردازش تصویر در تفسیر نتایج آزمون ترازولیوم و مقایسه آن با روش ارزیابی چشمی (روش مرسوم ارزیابی توسط کاربر) انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تعیین قوه‌نامیه بذرها قبل از اجرای آزمایش، آزمون جوانه‌زنی استاندارد انجام شد. از آن‌جا که آزمون ترازولیوم، وابسته به روش تیماری، شرایط آزمایش و گونه گیاهی است، در پژوهش حاضر بذر علف‌هرز پهن‌برگ ماشک گل‌خوشه‌ای (*Vica villosa* Roth.) و گیاه زراعی باریک برگ گندم (*Triticum aestivum* L.) برای بررسی توانایی پردازش تصویر در ارزیابی نتایج آزمون ترازولیوم به کار گرفته شد. این آزمایش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه گروه مکانیک بیوسیستم دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از: ۱) روش‌های تشخیص قوه‌نامیه شامل سه روش چشمی، RGB و Lab، ۲) نوع گیاه شامل دو گیاه گندم و ماشک‌گل‌خوشه‌ای، ۳) روش‌های خراش‌دهی فیزیکی شامل پنج روش برش‌عرضی و طولی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد بدون تیمار فیزیکی و ٤) مدت زمان قرارگیری در ترازولیوم در دو سطح۱۰ و ٢٤ ساعت بودند. بذر هریک از گونه‌ها (۳۰ عدد) روی کاغذ صافی در پتری‌دیش‌های با قطر نُه سانتی‌متر قرار گرفتند و حدود ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطـر به آن‌ها افزوده شد. سپس پتری‌دیش‌های حاوی بذر در دمای اتاق (۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد) و شرایط ١٦ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شدند. شمارش بذرهای جوانه‌دار هر روز حداقل دو مرتبه انجام شد و بذرهای جوانه‌زده (اندازه ریشه‌چه به طول یک میلی‌متر) حذف شدند؛ شمارش تا زمانی که سه روز متوالی جوانه‌زنی مشاهده نشد، ادامه یافت. در نهایت میانگین درصد جوانه‌زنی گندم و ماشک که به‌ترتیب ٩٦ و ٨٥/٦٧ درصد بود، به‌دست آمد.

پس از اطمینان از سالم بودن بذرها، به‌منظور تعیین قوه‌نامیه بذرها از آزمون ترازولیوم یک درصد استفاده شد. برای این منظور، ۳۰ عدد بذر از هر گونه به مدت ١٤ ساعت در داخل آب مقطر خیسانده شدند. برای تهیه محلول ترازولیوم، ابتدا ۲/۷۰ گرم از ماده پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب (محلول شماره یک) و ۲/۳۷ گرم از دی سدیم هیدروژن فسفات (Na_2HPO_4) در ۲۵۰ میلی‌لیترآب (محلول شماره دو) حل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول شماره یک به ۱۵۰ میلی‌لیتر از محلول شماره دو اضافه شد. در نهایت ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر حاصل با یک گرم نمک ترازولیوم (۳و۳و۲- تری‌فنیل‌ترازولیوم کلراید (TTC) محصول شرکت مرک (Merck) آلمان) ترکیب شد. به‌منظور

رنگ‌پذیری بهتر بذرها، پس از سپری شدن مرحله آبنوشی (۱۴ ساعت در آب مقطر در دمای اتاق)، تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی مختلف شامل برش‌عرضی و طولی، خراش‌دهی با سمباده و سوزن‌زنی روی بذرهای این دو گونه گیاهی در سه پتری‌دیش (سه تکرار) اعمال شد و سپس در تاریکی در دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از اعمال تیمارهای فیزیکی، بذرها در داخل محلول تترازولیوم در دو مدت زمان (۱۰ و ۲۴ ساعت) نگهداری شدند. به‌منظور ارزیابی قوه‌نامیه بذرها، ابتدا تصاویر بذرهای داخل هر پتری‌دیش با استفاده از دوربین مدل Logitechc920 (دوربین در داخل یک جعبه مخصوص تعبیه شده بود) تهیه شد و سپس ارزیابی به روش چشمی نیز انجام شد. در واقع برای تعیین تعداد و کیفیت بذرهای رنگ‌گرفته، از سه روش مشاهده چشمی (شمارش رنگ‌پذیری بذرها توسط سه فرد متخصص)، فضای رنگی RGB و فضای رنگی Lab استفاده شد. فضای رنگی RGB از سه مولفه رنگی قرمز، سبز و آبی تشکیل شده است که هر کدام بین مقادیر صفر تا ۲۵۵ تغییر می‌کند. هر پیکسل (کوچکترین واحد تشکل دهنده تصویر) رنگی در تصاویر RGB دارای مقدار مشخصی از رنگ قرمز، سبز و آبی است (Gonzalez *et al*., 2002). همچنین فضای رنگی Lab از سه مولفه L* معادل روشنایی، مولفه a* دامنه رنگ از سبز به قرمز و مقادیر b* دامنه رنگ از زرد به آبی است (Chaudhary *et al*., 2012). در این روش‌ها بعد از گرفتن تصاویر با دوربین، تصاویر در داخل نرم‌افزار Matlab آستانه‌گذاری شدند و مؤلفه R و a به‌ترتیب از روش‌های RGB (آستانه از صفر-۲۵۵) و Lab (آستانه‌گذاری از صفر -۳۰) محاسبه شدند. بعد از محاسبه مؤلفه‌ها و به‌منظور رسم نمودارها، همه داده‌ها بر اساس درصد که همان واحد ارزیابی چشمی نیز می‌باشد، ارائه شدند. ارزیابی و پردازش تصاویر با استفاده از نرم افزار Matlab و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS روی داده‌های مشاهده چشمی، مؤلفه R در فضای رنگی RGB و مؤلفه a در فضای رنگی Lab انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ و ۰/۰۱ صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که همه اثرات اصلی شامل تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی، نوع گیاه، زمان تیمار با محلول تترازولیوم و روش‌های ارزیابی قوه‌نامه بذرها روی میزان رنگ‌پذیری در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی‌دار بود (جدول ۱). همچنین علاوه بر اثرات اصلی فاکتورهای نام برده، اثر متقابل، اثر سه‌گانه و چهارگانه هر چهار فاکتور مورد بررسی نیز در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد معنی‌دار بود.

اثر مدت زمان تیمار با تترازولیوم بر درصد رنگ‌پذیری گندم و ماشک گل خوشه‌ای

با توجه به نتایج مقایسه میانگین، تأثیر مدت زمان حضور بذرها روی رنگ‌پذیری دو گیاه گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای تقریباً یکسان بود، به‌طوری‌که در هر دو گیاه، بیشترین درصد قوه‌نامیه یا رنگ‌پذیری (۶۰ و ۴۱ درصد به‌ترتیب در گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای) به تیمار حضور بذرهای این گیاهان در محلول تترازولیوم به مدت ۲۴ ساعت تعلق داشت. (شکل ۱). همچنین در هر دو گیاه، اختلاف معنی‌داری بین مدت زمان ۱۰ و ۲۴ ساعت حضور بذرها در تترازولیوم مشاهده شد. این نشان می‌دهد که فاکتور مدت زمان قرارگرفتن بذرها در محلول تترازولیوم می‌تواند یک عامل بسیار مهم در تعیین میزان رنگ‌پذیری و در نتیجه تشخیص قابلیت زنده‌بودن بذر باشد؛ این عامل به‌ویژه در بذرهایی که دارای پوسته سخت می‌باشند و آب به سختی در آن‌ها نفوذ می‌کند می‌تواند به خوبی

در میزان رنگ‌پذیری تأثیرگذار باشد. فرانکا-نتو و همکاران (França-Neto *et al.*, 1998) در ارزیابی قوه‌نامیه گندم با آزمون ترازولیوم در مدت زمان حداقل ۲٤ ساعت حضور در ترازولیوم گزارش کردند که طی این مدت (زمان ۲٤ ساعت)، بذرهای گندم بیشترین رنگ‌پذیری را نشان دادند.

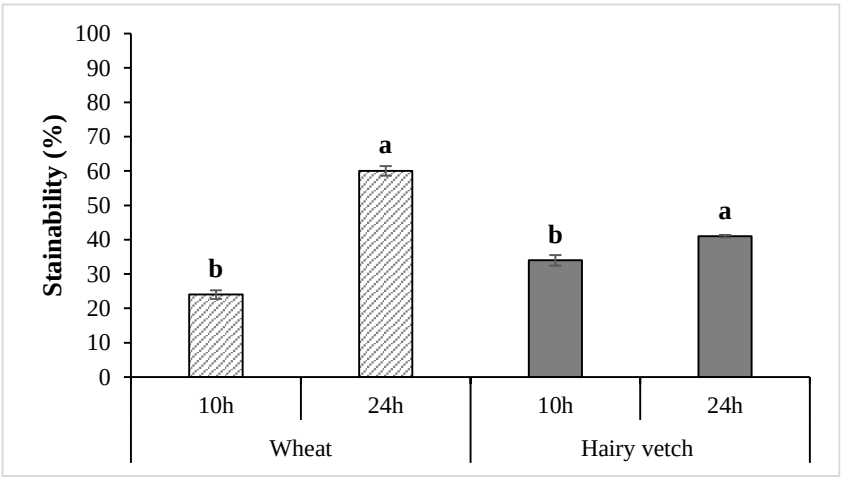
جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف خراش‌دهی، مدت زمان تیمار با ترازولیوم، روش‌های ارزیابی قوه‌نامیه و نوع گیاه روی رنگ‌پذیری بذر

Table 1. Variance analysis of the effect of different physical treatments, duration of exposure to the tetrazolium solution, the method of identifying the stainability and plant species on the percentage of seed stainability

S.O.V	df	**stainability**
DFT[1]	4	1744.01**
Plant	1	8328.36**
Time	1	6260.33**
MIV[2]	2	9165.75**
DFT*Plant	4	565.83**
DFT*Time	4	274.26**
DFT*MIV	8	415.87**
Plant*Time	1	1266.51**
Plant*MIV	2	4350.32**
Time*MIV	2	1045.48**
DFT*Plant*Time	4	71.70**
DFT*Plant*MIV	8	244.66**
DFT*Plant*Time*MIV	18	111.10**
Error	119	23.31
CV%		10.793

Ns، * و **: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱.

Ns. * and **: non-significant and Significance at 0.05 and 0.01 of probability levels, respectively.



شکل ۱- درصد رنگ‌پذیری بذرهای گندم و ماشک‌گل خوشه‌ای تحت تیمار مدت زمان قرارگیری در محلول ترازولیوم. تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ($p < 0.05$) با یکدیگر ندارند.

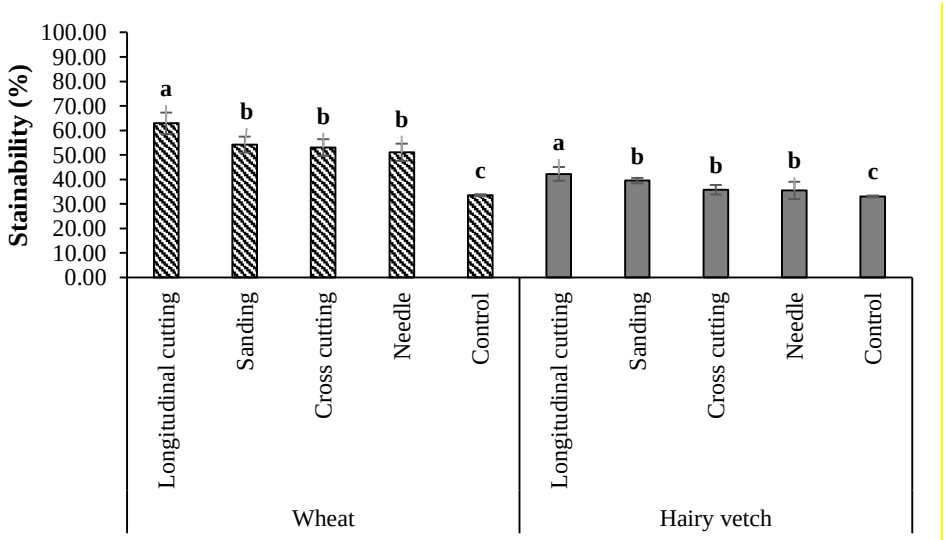
Figure 1. Staining percentage of wheat and hairy vetch seeds at different exposure time to the tetrazolium solution. Treatments with the similar letters are not significantly ($p < 0.05$) different.

[1] Different physical treatments (تیمارهای مختلف فیزیکی)

[2] The method of identifying stainability (روش‌های شناسایی رنگ‌پذیری)

اثر تیمارهای مختلف خراش‌دهی فیزیکی بر درصد رنگ‌پذیری گندم و ماشک گل خوشه‌ای

نتایج این بخش بدون در نظر گرفتن فاکتور مدت زمان قرارگیری در محلول تترازولیوم با هدف مقایسه تاثیر بین تیمارهای مختلف فیزیکی (برش‌عرضی، برش‌طولی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد بدون تیمار فیزیکی) بر میزان رنگ‌پذیری یا درصد قوه‌نامیه دو گیاه گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به نتایج مقایسه میانگین، تأثیر تیمارهای خراش‌دهی روی رنگ‌پذیری دو گیاه گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای تقریباً یکسان بود، به‌طوری‌که در هر دو گیاه، بیشترین درصد قوه‌نامیه یا رنگ‌پذیری (٦٣ و ٤٣ درصد به‌ترتیب در گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای) در تیمار برش‌دهی طولی مشاهده شد. همچنین کمترین میزان رنگ‌پذیری در هر دو گیاه (٣٤ و ٣٣ درصد به‌ترتیب در گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای) به تیمار شاهد یا بدون اعمال تیمار خراش‌دهی تعلق داشت. تیمار برش‌دهی طولی در هر دو گیاه، اختلاف معنی‌داری با بقیه تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی نشان دادند؛ البته در هر دو گیاه، تیمارهای برش‌دهی عرضی، سمباده‌زنی و سوزن‌زنی، اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۲).



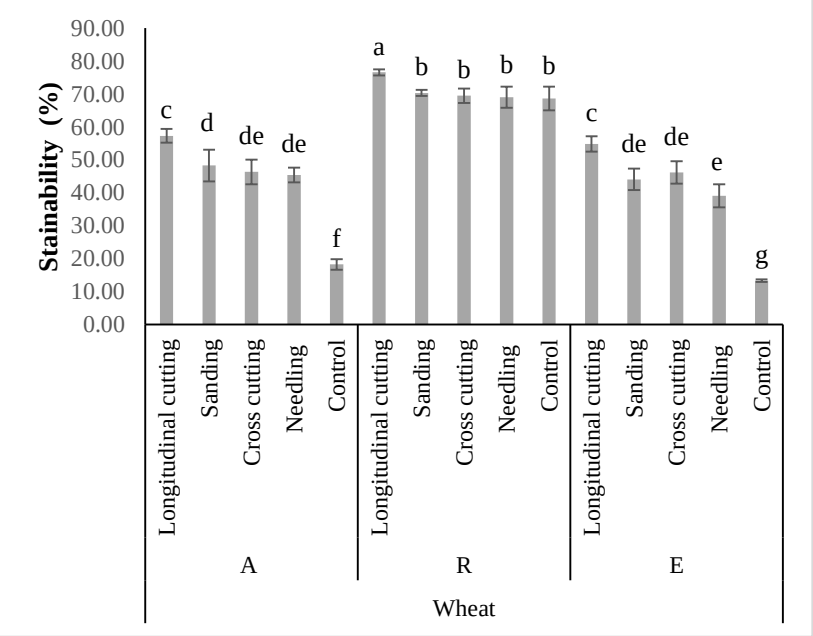
شکل ۲- درصد رنگ‌پذیری بذرهای گندم و ماشک‌گل خوشه‌ای تحت تیمارهای مختلف خراش‌دهی فیزیکی. تیمارهای دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Figure 1. Staining percentage of wheat and hairy vetch seeds under different physical scarification treatments. Treatments with the similar letters are not significantly ($p < 0.05$) different.

مقایسه روش‌های ارزیابی رنگ‌پذیری بذر گندم و ماشک گل خوشه‌ای در حضور تیمارهای مختلف خراش‌دهی فیزیکی بدون در نظر گرفتن زمان حضور بذرها در تترازولیوم

نتایج مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی (برش‌عرضی و طولی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد) بر میزان رنگ‌پذیری بذر گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای با توجه به سه روش ارزیابی رنگ‌پذیری بذر شامل روش Lab (مؤلفه A)، روش RGB (مؤلفه R) و روش ارزیابی چشمی (E) نشان داد که بیشترین رنگ‌پذیری بذر در هر سه روش ارزیابی، در تیمار

برش‌دهی طولی مشاهده شد. تیمار برش‌دهی طولی بذر گندم بر اساس سه روش ارزیابی با سایر تیمارها روی این گونه اختلاف معنی‌داری داشت. میزان رنگ‌پذیری بذر گندم با اعمال تیمار برش‌دهی طولی بر اساس روش‌های ارزیابی چشمی، Lab و RGB به‌ترتیب ۵۵، ۵۷، ۷۷ درصد بود. از این نظر، روش RGB با دور روش ارزیابی چشمی و روش Lab متفاوت بود و دو روش آخر در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه روش‌های ارزیابی چشمی (E)، روش RGB (R) و روش Lab (A) رنگ‌پذیری بذر گندم تیمار شده با ترازولیوم با اعمال تیمارهای مختلف فیزیکی شامل برش‌طولی و عرضی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد (بدون تیمار فیزیکی). تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Figure 3. Comparison of the stainability methods of wheat seeds treated with tetrazolium including visual assessemnt method (E), RGB method (R), and Lab method (A) by applying different physical treatments including longitudinal cutting, cross-cutting, sanding, needling, and control (without physical treatment). Columns with similar letters are not significantly ($p < 0.05$) different.

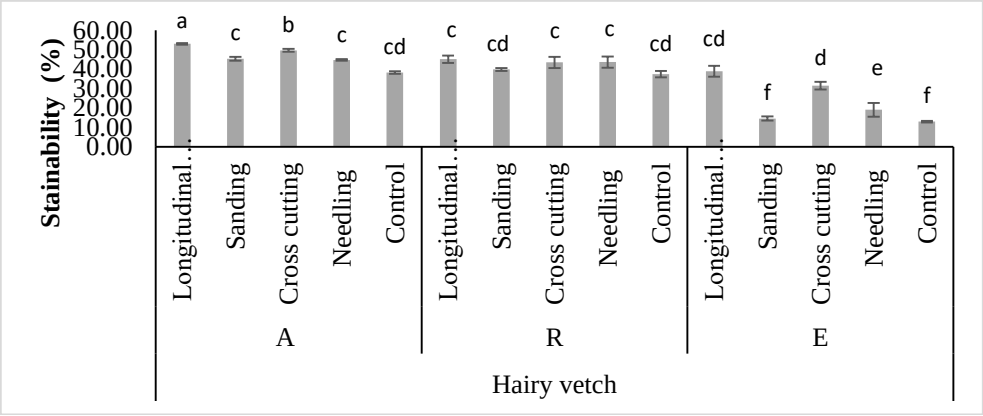
لازم به ذکر است که از آن‌جا که نتایج درصد رنگ‌پذیری بذر گندم در روش RGB (۷۵درصد) به درصد جوانه‌زنی گندم (۹۶ درصد) نزدیک بود، بنابراین می توان روش RGB را نیز به‌عنوان روش مطلوب در نظر گرفت (شکل ۳). مقایسه ۱۵ تیمار اثرگذار در رنگ‌پذیری بذر گندم نشان داد که کمترین رنگ پذیری به تیمار کنترل یا شاهد در روش ارزیابی چشمی با درصد رنگ‌پذیری ۱۳/۲۸ تعلق داشت که از نظر آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد. تیمارهای برش‌دهی عرضی، سوزن‌زنی و سمباده‌زنی در روش ارزیابی RGB با رنگ‌پذیری حدود ۶۹ درصد، تفاوت معنی‌داری با بقیه تیمارها نشان دادند، ولی با یکدیگر در یک گروه آماری قرار گرفتند. این سه تیمار در روش RGB پس از تیمار برش‌دهی طولی مربوط به همین روش ارزیابی، بیشترین رنگ‌پذیری را در مقایسه با سایر تیمارها داشتند. همچنین تیمارهای برش‌دهی عرضی و سوزن‌زنی در روش ارزیابی Lab، با تیمارهای برش‌دهی عرضی و سوزن‌زنی در روش ارزیابی چشمی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند

و در یک گروه آماری قرار گرفتند. علاوه بر این، تیمار برش‌دهی طولی بر اساس روش‌های ارزیابی Lab و چشمی در یک گروه آماری قرار گرفتند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند. همچنین تیمار شاهد یا کنترل روش ارزیابی Lab با همه تیمارهای مورد بررسی در رنگ‌پذیری بذر گندم تفاوت معنی‌داری نشان داد.

به‌طورکلی روش ارزیابی RGB در مقایسه با روش‌های ارزیابی Lab و چشمی، درصد رنگ‌پذیری بالاتری را برای گندم نشان داد، به طوری که درصد رنگ‌پذیری در روش RGB نزدیک به درصد جوانه‌زنی بذر گندم بود؛ این موضوع می‌تواند برتری این روش را نشان دهد.

نتایج مقایسه میانگین ۱۵ تیمار اثرگذار در رنگ‌پذیری بذر ماشک گل‌خوشه‌ای نشان داد که تأثیر تیمارها متفاوت بوده است (شکل ٤). برش‌دهی طولی بذر ماشک گل خوشه‌ای، منجر به بیشترین رنگ پذیری در هر سه روش ارزیابی شد و تیمار برش‌دهی طولی در روش ارزیابی Lab با بیشترین رنگ‌پذیری (۵۳ درصد رنگ‌پذیری)، اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. پس از تیمار برش‌دهی طولی، تیمار برش‌دهی عرضی در روش ارزیابی Lab با ۵۰ درصد رنگ‌پذیری، منجر به بیشترین رنگ‌پذیری بذر ماشک گل‌خوشه‌ای شد و با سایر تیمارها نیز اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین میزان رنگ‌پذیری در تیمارهای سمباده‌زنی و شاهد در روش ارزیابی چشمی با ۱۵ و ۱۳ درصد مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند، اما هر دو تیمار با هم در یک گروه آماری قرار گرفتند.

به‌طورکلی، روش ارزیابی Lab در مقایسه با روش‌های ارزیابی RGB و چشمی، درصد رنگ‌پذیری بالاتری (نزدیک به جوانه‌زنی ماشک گل‌خوشه‌ای) را برای بذرهای ماشک گل خوشه‌ای با برش طولی نشان داد؛ بنابراین این روش می‌تواند به‌عنوان روشی جایگزین برای روش مشاهده چشمی به‌منظور بیان درصد رنگ‌پذیری در گیاه ماشک گل‌خوشه‌ای مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ٤- شکل ۳- مقایسه روش‌های ارزیابی چشمی (E)، روش RGB (R) و روش(A) Lab رنگ‌پذیری بذر ماشک گل‌خوشه‌ای تیمار شده با تترازولیوم با اعمال تیمارهای مختلف فیزیکی شامل برش‌طولی و عرضی، سمباده‌زنی، سوزن‌زنی و شاهد (بدون تیمار فیزیکی). تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

seeds treated with tetrazolium including visual assesment Figure 4. Comparison of the stainability methods of hairy vetch method (E), RGB method (R), and Lab method (A) by applying different physical treatments including longitudinal cutting, cross-cutting, sanding, needling, and control (without physical treatment). Columns with similar letters are not significantly ($p < 0.05$) different.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که به کمک پردازش تصویر می‌توان بذرهای با قوه‌نامیه بالا را از بذرهای با قوه‌نامیه پایین در آزمون ترازولیوم تشخیص داد. نگهداری بذرهای گندم و ماشک گل خوشه‌ای به مدت ۲٤ ساعت در محلول ترازولیوم، رنگ‌پذیری را نسبت به تیمار ۱۰ ساعت افزایش داد. همچنین برش‌دهی طولی بذر گندم و ماشک گل‌خوشه‌ای، رنگ‌پذیری را در مقایسه با سایر تیمارهای خراش‌دهی فیزیکی افزایش داد. هر دو روش RGB و Lab به خوبی روش چشمی، توانایی تشخیص بذرهای رنگ گرفته را داشتند، با این حال، روش RGB برای تعیین میزان رنگ‌پذیری بذر گندم و روش Lab برای تعیین میزان رنگ‌پذیری بذر ماشک گل‌خوشه‌ای بهتر بود. بر این اساس و با توجه به اهمیت زمان و زمان‌بندی در پژوهش‌های کشاورزی، روش‌های RGB و Lab می‌تواند در مقایسه با روش چشمی برای تعیین قوه‌نامیه در آزمون ترازولیوم کارآمدتر باشند.

منابع

Behtari, B., De Luis, M. and Nasab, A.D.M. 2014. Predicting germination of *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia* seeds by using image analysis. Turkish J. Agric. For. 38: 615-623.

Chaudhary, P., Chaudhari, A.K., Cheeran, A.N., and Godara, S. 2012. Color transform based approach for disease spot detection on plant leaf. Int. J. comput. Sci. tel. 3: 65-70.

Gonzalez R.C. 2002. Digital image processing. Second edition. Upper Saddle River, NJ, US: Prentice Hall;.

Gomes-Junior, F.G., Mondo, V.H., Cicero, S.M., McDonald, M.B. and Bennett, M.A. 2009. Evaluation of priming effects on sweet corn seeds by SVIS. Seed Technol. 31: 95-100.

França - Neto, J.B., Krzyzanowski, F.C. and Costa, N.P. 1998. Teste De Tetrazólio Em Sementes De Soja. Embrapa-Cnpso, Londrina, Pr. 72Pp.

ISTA, 2003. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Working Sheets on Tetrazolium Testing, Seed Sci. Technol. 2:149.

Marcos-Filho, J., Bennett, M.A., Mcdonald, M.B., Evans, A.F. and Grassbaugh, E.M. 2006. Assessment of melon seed vigour by an automated computer imaging system compared to traditional procedures. Seed Sci. Technol. 34: 485-497.

Neto, J.F., Krzyzanowski, F.C. and Da Costa, N.P. 1998. *O Teste De Tetrazólio Em Sementes De Soja*. Embrapa – Cnpso.

Peñaloza, P., Ramirez-Rosales, G., McDonald, M.B., and Bennett, M.A. 2005. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) seed quality evaluation using seed physical attributes, saturated salt accelerated aging and the seed vigour imaging system. Electron. J. Biotechnol.. 8: 0-0.

Van Mourik, T.A., Stomph, T.J., and Westerman, P.R. 2003. Estimating Striga hermonthica seed mortality under field conditions. Asp. Appl. Biol. 69: 187-194.

Vankus, V. 1997. The tetrazolium estimated viability test for seeds of native plants. In National Proceedings: Forest and Conservation Nursery associations.