افغانستان اسلامی جمهوری دولت
د کرهنې، اوبو لګولو او مالداری وزارت

دولت جمهوری اسلامی افغانستان
وزارت زراعت، آبیاری و مالداری

Islamic Republic of Afghanistan

Ministry of Agriculture, Irrigation and livestock

ریاست تصدیق دهی تخمهای بذری

امریت لابراتوارهای تصدیق دهی تخمهای بذری

رهنمود ازمایشات صحت تخم های بذری

سال ۱۳۹۷

مقدمه

آزمایش صحت تخم یکی از روشهای اساسی تنظیم و کنترول امراض تخم زی، پتوجن های ناقل توسط تخم، و فعالیت های ضروری بخاطر تنظیم و کنترول از طریق ارایه سرتیفیکیت صحی و پروگرام های قرنطین داخلی و بین اللملی تجارت تخم میباشد. آزمایش صحت تخم یک کار اساسی بخاطر حصول اطمینان از صحت تخم مادری میباشد که به منظور تولید تخم، جرم پلازم نباتی که در تحقیق و انکشاف تولید مورد استفاده قرار میگیرد و در نتیجه باعث افزایش تولید ورقابت در صنعت تخم میشود. صحت تخم باعث افزایش خاصیت کیفی سبزیجات و نباتات مزروعی در مارکیت میشود. در صنعت تخم تقاضا بخاطر آزمایش صحت تخم رو به افزایش است. صنعت تخم در عرصه صحت تخم دو برابر مسئولیت دارد: تخم های باکیفیت را در دسترس دهاقین و تولید کننده گان قرار میدهد و به قانون ملکیت فکری احترام میگزارد.

کشت تخم های بذری آلوده یا مصاب باعث انتقال پتوجن ها از تخم به نباتات، کاهش قدرت جوانه زنی و قدرت تخم، و همچنان حاصل را متاثر میسازد. امراض عمده تخم زی عبارت از مرض بلایت یا لکه های نصواری برنج، نیماتود نوک سفید، ایرکوکل در گندم، بلایت بکتریائی برگ شالی، آتشک، سیاقاق، پوسیدگی جوانه ها، قرغنه، هالو بلایت و بعضی امراض ویروسی میباشد. این باعث کاهش حاصل نباتات مزروعی، نباتات پلی دار، نباتات تیلی و سبزیجات میشود.

موضوع صحت تخم در تجارت بین المللی تخم قابل اهمیت است. از شروع تجارت آزاد، اکثر کشورها بخاطر نیازمندی های حفظ الصحه نباتی به هدف جلوگیری از داخل شدن یک پتوجن ویرانگر به کشور شان قوانین و مقررات را وضع نموده اند.

اهمیت اقتصادی امراض تخم زی همرای تغیر سناریوی جهانی در روشنی توافق عمومی تجارت افزایش مییابد. موضوعات حفظ الصحه نباتی (Sanitary and Phytosanitary) سازمان تجارت جهانی بالای کشور های رو به انکشاف فشار وارد میکند که توجه خاص بالای آزمایشات صحت تخم نمایند. بخاطر تنظیم امراض تخم از طریق بین بردن اناکولم ، قوانین و مقررات قرنطینی، طریقه های زراعتی و معامله تخم با مواد کیمیاوی پروگرام های زیادی روی دست گرفته شده است. تصدیق دهی تخم های بذری منحیث یک بخش سیستم تنظیم همه جانبه آفات نباتی (IPM) محسوب میشود. بخاطر مشخص کردن امراض تخم زی، استندرد های مزرعه و تخم برای اکثر نباتات ثابت شده است. در این رابطه، همکاری های ملی و بین المللی برای موثریت صحت تخم و حفاظت نبات اتخاذ شده است.

فهرست

فصل اول 5
اصطلاحات پتالوژی تخم 5
فصل دوم 7
ازمایشات صحت تخم 7
نمونه گیری برای آزمایش صحت تخم های بذری 7
طریقه های آزمایش صحت تخم های بذری 7
معاینه تخم خشک 8
پروسیجر معاینه تخم خشک: 8
آزمایش شستشو Washing Test 9
میتود های انکبیشن: 10
میتود کاغذ جاذب: 11
پروسیجر میتود آزمایش کشت: 12
تهیه نمودن پتری دیش ها: 12
مواجه شدن به مشکلات: 14
میتود 2, 4-D 15
میتود اگر پلیت: 16
آزمایش علایم جوانه ها: 18
میتود آزمایش اگر تیوب: 19
آزمایش رشد و نمو (Growing on Test): 20
فصل سوم 20
تشخیص پتوجن های تخم زی 20
طریقه تشخیص مرض سیاقاق جزئی یا کرنل بانت 20
طریقه تشخیص مرض سیاقاق معمولی 22
طریقه تشخیص مرض بلک پاینت 22
طریقه تشخیص مرض بلایت خوشه ها 23
طریقه تشخیص مرض بلاچ گندم 23
طریقه تشخیص مرض سیاقاق عریان یا لوز اسمت 24
طریقه تشخیص مرض داغهای نصواری شالی 25
طریقه تشخیص مرض بلاست شالی 25
تشخیص مرض لکه های بنفش تخم سویابین 25
طریقه تشخیص مرض پوسیدگی سیاه 26

طریقه تشخیص مرض پوسیدگی ساقه سویابین 27
طریقه تشخیص مرض پوموپسس بلایت بادنجان سیاه 27
طریقه تشخیص مرض پژمردگی پالک 27
طریقه تشخیص مرض اسکوچایتا بلایت نخود 28
طریقه تشخیص مرض انترگنوز لوبیا 28
فصل چهارم 29
فورمه های ازمایشات صحت تخم 29
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه معاینه تخم خشک 29
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه شستشو 30
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه سودیم هایدروکساید 31
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه شمارش امبریو 32
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه کاغذ جاذب و اگرپلیت 33
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه کاغذ جاذب و اگر پلیت 34
فورمه آزمایش صحت تخم طریقه اگر تیوب، رشد و نمو و علایم جوانه ها 35

فصل اول
اصطلاحات پتالوژی تخم

پتالوژی تخم:

علمیکه از تخم و عوامل مرض زا آن بحث میکند عبارت از پتالوژی تخم است. این علم نه تنها عامل مرض را تشخیص میکند بلکه از نقش تخم منحیث منبع مواد ملوث کننده، بقاء پتوجن ها و از اقدامات که بخاطر کنترول امراض تخم زی گرفته میشود بحث میکند.

پتوجن های تخم زی:

عامل ملوث کننده همراه با تخم باعث امراض جوانه ها یا نبات میشود که بنام پتوجن های تخم زی نامیده میشود. در این حالت تخم شاید علایم مرض را از خود نشان دهد یا خیر. این اصطلاح شامل تمام مایکروارگانیزم های مرض زا نباتی (فنگس، بکتریا، نیماتودها و ویروس ها) که توسط تخم انتقال میگردد شامل میشود.

اناکولم تخم زی:

عبارت از واحد ملوث کننده تخم زا که توسط تخم انتقال میشود.

امراض تخم زی:

یک مرض تخم زی نمیباشد؛ بلکه عبارت از پتوجن است که در تخم زیست میکند اما این اصطلاح مفهوم پیوستگی پتوجن ها را با تخم وقابلیت انتقال آنها از طریق تخم بیان میکند که در نتیجه پتوجن ها باعث انکشاف مرض در جوانه ها یا نبات میشود.

امراض تخم:

زمانیکه یک تخم شکار مرض شود در نتیجه باعث مصابیت و از بین رفتن تخم میشود. در چنین حالت علایم مرض در تخم شاید ظاهر شود یا خیر.

پتوجن تخم زی سطحی:

هرگاه یک پتوجن در سطح تخم قرار داشته باشد عبارت از پتوجن تخم زی سطحی است. مانند سپور های بنت.

پتوجن تخم زی داخلی:

هرگاه یک پتوجن در داخل تخم قرار داشته باشد، و ارتباط بین میزبان و پتوجن در داخل تخم برقرار شود، عبارت از پتوجن تخم زی داخلی است. مانند سیاقاق، انترکنوز و بلایت ها.

مصابیت تخم:

مصابیت تخم عبارت از نفوذ عمیق پتوجن در داخل انساج تخم مانند پوش تخم، جنین تخم، اندوسپرم، پریکارپ و غیره میباشد. مصابیت شاید در قسمت جنین تخم باشد مانند سیاقاق جزئی (Loose smut) گندم و جو یا خارج از جنین تخم مانند پریکارپ پوش تخم و غیره باشد مانند سیاقاق بدبوی یا پوشیده گندم، سیاقاق برهنه یولاف یا مرض خطی برک جو.

آلودگی تخم:

زمانیکه اناکولم بالای سطح تخم از طریق تخم انتقال میشود، بطور مثال مرض کرنل بنت گندم یا زمانیکه اناکولم مخلوط با تخم مانند بقایای نباتی یا ارگانیزم های مرض زا، مانند بوغمه های نیماتودی (galls)، اسکلروشیا، توپ های بکتریایی، کلوخ وغیره.

مایکروفلورا تخم زی:

عبارت از یک اصطلاح کلی است که باکتریا، فنگس، نیماتودها و دیگر مایکروفلورا یا ویروس های پیوسته با تخم که باعث مرض تخم یا نبات شود یا خیر. این شامل مایکروفلورا پرازیتی و سپروفیتیک میشود.

مایکوفلورا تخم:

امراض فنگسی پیوسته با تخم شاید توانائی مصابیت تخم یا نبات را داشته باشد عبارت از مایکوفلورا تخم است. این شامل مایکوفلورا پرازیتی و سپروفیتیک میشود.

انتقال امراض تخم:

عبارت از انتقال پتوجن از طریق انساج انتقالی از تخم به نهالی و بلاخره به نبات میباشد. یک پتوجن تخم زی شاید از طریق تخم انتقال گردد یا خیر.

معامله تخم:

معامله تخم عبارت از پروسه های کیمیاوی، بیولوژیکی یا فزیکی میباشد که بالای تخم تطبیق میشود و تخم را حفاظت مینماید و صحت تخم و جوانه زنی مناسب را یقینی میسازد.

کیفیت تخم:

کیفیت تخم مفهوم ویژه گی های متفاوت تخم یعنی خالصیت، رطوبت، و جوانه زنی را بیان میکند. این ویژه گی ها مورد علاقه بخش های مختلف صنعت – تولید کننده، پروسس کننده، تاجر، دهقان، و کارمندان تصدیق دهی، و ادارات که در کنترول کیفیت تخم دخیل اند قرار گرفته است.

صحت تخم:

عبارت از موجودیت یا عدم موجودیت ارگانیزم های مرض زا (فنگس، باکتریا، ویروس) و آفات حیوانی مانند نیماتودها، حشرات، و همچنان عوامل غیر زنده که باعث خراب شدن کیفیت تخم بذری میشود.

آزمایش صحت تخم:

آزمایش صحت تخم عبارت از شناسائی و تشخیص مایکروارگانیزم های مضره تخم زی میباشد.

هدف آزمایش صحت تخم:

هدف آزمایش صحت تخم تعین حالت صحی نمونه تخم بذری میباشد که از انبار تخم بذری نمایندگی میکند از این طریق میتوان کیفیت صحت و عدم صحت آنبار های متفاوت را مقایسه گرد.

فصل دوم

ازمایشات صحت تخم

نمونه گیری برای آزمایش صحت تخم های بذری

نمونه گیری یک کلید است بخاطر بدست آوردن نتائج دقیق و موثق از آزمایشات صحت تخم میباشد. اهداف نمونه گیری تخم طوریکه در قوانین ایستا بخاطر ازمایش تخم بیان شده است بدست آوردن نمونه به اندازه کافی برای آزمایش که در آن احتمالا جز اصلی موجود باشد که تنها ذریعه وقوع آن در انبار تخم مشخص میشود. دو سروده اساسی نمونه گیری وجود دارد. اول، این بسیار حیاتی است که نمونه برای آزمایش دقیقا در کل ترکیب انبار تخم نمایندگی میکند. دوم، این مهم نیست که چطور یک ازمایش دقیقا انجام میگردد نتایج فقط از کیفیت نمونه ارائه شده برای تحلیل و تجزیه نمایندگی میکند. همچنان پیش بینی احتیاطی موجود است که اکثرا به شمول نتائج آزمایش که در آن بیان میشود که تجزیه و تحلیل به اساس نمونه آزمایش شده و ضمانت نمیکند که نتائج از تمام انبار نمایندگی کند.

تمام مراحل که بخاطر نمونه گیری برای ارزیابی کیفیت تخم استفاده میشود به آزمایش صحت تخم نیز مورد استفاده قرار میگیرد.

طریقه های آزمایش صحت تخم های بذری

میتودولوژی که به خاطر آزمایشات صحت تخم بکار میرود باید دارای معیارهای مشخص یا معین باشد. در یک میتود دلخوا آزمایش صحت تخم باید موارد ذیل در نظر گرفته شود:

1- **Specificity اختصاصیت:** میتود است که باید پتوجن مورد هدف را از تمام ارگانیزم های که در تخم موجود است تفریق نمود.
2- **Sensitivity حساسیت**: میتود که بخاطر تشخیص امراض تخم زی بکار میرود باید به اندازه کافی دقیق و حساس باشد حتی اگر در انبار تخم کم شیوع کرده باشد.
3- **Simplicity سادگی**: میتود که بخاطر آزمایش صحت تخم بکار میرود باید بسیار ساده باشد که حتی تکنیشن های لابراتوار آنرا تطبیق گرده بتواند و به کارکنان با ظرفیت بالا نیاز نباشد.
4- **Cost effectiveness مثریت قیمت**: طریقه یا روش که به خاطر آزمایش صحت تخم بکار میرود باید کم مصرف و هزینه آزمایش باید نظر به حاصل هر نبات باشد.
5- **Reliability قابل اطمینان:** روش که بکار میرود به اندازه دقیق و موثر باشد که از تکرار آزمایش نمونه ها عین انبار بدون درنظرداشت که کی آزمایش را انجام داده است جلوگیری شود.

معاینه تخم خشک

این طریقه آزمایش بخاطر تشخیص پتوجن های تخم زی که باعث بی رنگی پوش تخم، تغیر در سایز و شکل تخم میشود تطبیق میشود. این طریقه بخاطر تشخیص پتوجن های که علایم متفاوت ساختمان های قابل دید که همرای تخم مخلوط میباشد قابل تطبیق است. برعلاوه، معاینه تخم خشک همچنان در مورد حشره خوردگی و صدمات میخانیکی تخم معلومات فوری میدهد. نمونه های که به مواد کیمیاوی معامله شده باشد، باید به احتیاط کامل مورد تجزیه قرار گیرد.

ساختمان های ملوث کننده بالای سطح تخم، تخم های آلوده با سیاقاق، گال های کوچک که در هنگام آزمایش خالصیت غیر قابل مشاهده است؛ از این رو، تجزیه کننده خالصیت تخم و صحت تخم باید با هم همکاری نزدیک داشته باشد. تخم خالص، تخم دیگر نباتات و مواد اضافی جدا شده باید توسط تجزیه کننده صحت تخم بخاطر تشخیص امراض تخم زی مورد ارزیابی قرار گیرد.

این یکی از آزمایش کیفی است که اندازه نمونه کاری استندرد بکار گرفته میشود. اندازه نمونه کاری در این آزمایش برابر است به اندازه نمونه کاری که در ازمایش خالصیت تخم که درتصدیق دهی تخم های بذری بکار میرود. تمام نمونه های ارائه شده بعد از راجستر در لابراتوار مورد آزمایش قرار میگیرد. این اولین مرحله برای تعین حالت صحی یک انبار تخم میباشد که انجام میشود .

پروسیجر معاینه تخم خشک:

تمام قسمت های نمونه تخم بدقت توسط قوه دید یا به کمک لینز دستی یا بزرگ کننده معاینه شود. در جریان معاینه بالای گال ها، اسکلیروشیا و کتله های سیاقاق تمرکز صورت گیرد. تخم های نارمل به دقت تحت معاینه قرار گیرد، بخاطر موجودیت تخم های بیرنگ و ساختمان های فنگسی به شمول سپورهای چسپیده بالای سطح تخم یا کتله های سپور های باهم پیوسته ازقدرت بزرگنمایی پائین استفاده شود. سپورها و دیگر ساختمان های قارچی مشخص گردد، تغیر رنگ علایمی است که به عامل مرض نسبت داده میشود زماینکه تغیر رنگ نامشخص باشد؛ باید یاداشت گردد.

علایم متفاوت قرار زیل اند:

1. پوسیدگی تخم و نیکروسس
2. تخم های چملک
3. تخم های دارای خالک ها و چین و چروک
4. ساختمان های تکثری فنجای
5. کتله های متراکم سخت مایسلیم
6. بیرنگ شدن تخم (زخم های سطحی حجرات مرده و رنگ باخته)

فواید آزمایش تخم خشک:

این طریقه ازمایش ساده و نتائج فوری در باره حالت صحی انبار تخم ارائه میکند. این طریقه آزمایش در وقت آزمایش خالصیت تخم انجام میشود تا از استفاده بیشتر کارگر و تجهیزات جلوگیری شود.

نواقص آزمایش تخم خشک:

اکثر فنجای پرازیتی علایم مرض را ازخود نشان نمیدهد، بنابرین نمیتواند تشخیص شود.

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش تخم خشک توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

وزن یا تعداد تخم های مصاب
فیصدی مصابیت =---------- X 100
وزن یا تعداد تخم های تحت آزمایش

آزمایش شستشو Washing Test

واشنگ تست یک طریق آزمایش صحت تخم میباشد که تنها بخاطر آزمایش پتوجن های تخم زی، اناکولم که بالای سطح تخم قرار دارد، تطبیق میشود. پس این طریقه آزمایش بخصوص فنجایی که عامل امراض سیاقاق (Smut and bunt) میزبان خاندان گندم میشود تطبیق میشود به استثنای مرض سیاقاق عریان گندم و جو. این طریقه ازمایش تنها بخاطر تشخیص *Tilletia Indica*، *Tilletia sp.*، سپورهای زوجی یا اواوسپور، سپورهای مرض آتشک و سپور های سیاقاق استفاده میشود. فنجایی عامل امراض آتشک سویابین، سرخی لبلبو و سرخی نبات گل آفتاب پرست توسط این ازمایش تشخیص میگردد استفاده میشود. در این طریقه آزمایش از نمونه های خوب ترکیب شده استفاده میشود. واشنگ تست یک ازمایش کیفی است که تاحال سمپل کاری معیاری توسط ایستا تعین نشده است. نمونه به اندازه معین یا ثابت برای انواع مختلف نباتات ارائه شده است. بطور عموم، برای تشخیص موجودیت و یا عدم موجودیت سپورهای فنجای از واشنگ تست استفاده میشود. با آنهم، اگر آزمایش کمی مورد نیاز است، تجزیه کننده به استفاده از یکی طریقه های را به کار ببرد تا تعداد سپورها در نمونه محاسبه شود.

مواد مورد نیاز واشنگ تست:

1. سنترفیوج
2. مایکروسکوپ مرکب
3. سلاید و پوشش سلاید
4. سوزن
5. تکان دهنده میخانیکی

6. هیموسایتومتر

پروسیجر واشنگ تست:

- دو گرام تخم را در داخل تیوپ انداخته و بالای آن 10 ملی لیتر آب اضافه نموده و بعدا مدت 10 دقیقه توسط تکاندهنده میخانیکی شور داده شود.
- همینطور این محلول معاینه شده یا سپورهای معلق توسط سنتریفیوج در درجه 3000 دور در فی دقیقه برای 20 دقیقه سنترفیوج گردد.
- محلول شفاف تنشین شده دور انداخته شده و سپورها در 2 ملی لیتر محلول لکتوفینول تعلیق شود.
- این محلول بعدا تحت مایکروسکوپ بخاطر موجودیت سپورها، کونیدیا، و دیگر ساختمان های تکثری فنجای تحت معاینه قرار گیرد.

استفاده از آله هیموسایتومتر برای تخمین کمی جایی که سپورها در فی گرام تخم توسط فورمول ذیل میتواند محاسبه گردد:

0, 0001: عبارت از مقدار محلول در وسط مرکزی آله هیموسایتومتر قرار دارد.

N: عبارت از تعداد سپورهای در نقطه مرکزی قراردارد.

V: عبارت از مقدار محلول که با محلول تانشین شده یا رسوب شده اضافه میگردد.

W: عبارت از وزن تخم های بذری آزمایش شونده است.

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش واشنگ تست توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

$$\text{تعداد سپورها در فی گرام تخم} = \frac{N \times V \times 10.000}{W}$$

فواید واشنگ تست:

این طریقه بخاطر تشخیص فوری مایکوفلورا سطحی موثر است. اواو سپورها و کلایمیدو سپورها توسط این طریقه تشخیص میشود.

نواقص واشنگ تست:

توسط این طریقه قابلیت زیستن سپورها و مواد اناکولم مشخص نمیشود.

میتود های انکبیشن:

میتود های کاغذ جاذب و اگرپلیت از جمله دو میتود است که بصورت عموم بخاطر مطالعه مایکروفلورا تخم استفاده میشود. با آنهم، برای تشخیص اکثر فنجایی که بالای تخم رشد میکند، یک تعداد زیاد کتاب های رهنمای تشخیص و کلید

منتشر شده تا تکسانومی فنجای را مورد مطالعه قرار داده از طریق تصاویر که روی آن برای تشخیص پتوجن ها استفاده میشود.

میتود کاغذ جاذب:

میتود کاغذ جاذب استندرد:

میتود کاغذ جاذب استندرد توسط عالم بنام Doyer در سال 1938 میلادی انکشاف داده شد که بعدا شامل قوانین ایستا گردید. فنجایی پیوسته با تخم تحت معاینه قرار میگیرد. به اساس عادت نمویی تشخیص میگردد. خصوصیات نموئی فنگس تنها میتواند همرای کار های عملی مورد مطالعه قرار گیرد. در اوایل یک تجزیه کننده باید سلاید از ساختمان تکثری مانند کونیدیا که بالای کونیدیافور تولید میشود، سپورها باهم یکجا در کتله، سپوردوشیا و اسیروالی، پکنیدیوسپورها در پکنیدیا و اسکوسپورها در اسکس ها (داخل پیریتیشیا) تهیه میگردد. اینها توسط مایکروسکوپ که قدرت بزرگنمایی زیاد باشد تحت معاینه قرار گیرد. برای تشخیص درست از ماخذ و نشریه های معتبر باید استفاده شود و یا از اشخاص که دارای ظرفیت عالی باشد کمک خواسته شود. تشخیص فنجای به اساس خصوصیات نموئی توسط مایکروسکوپ یک هنر است که تنها با تجربه آموخته میشود. این میتود یک میتود خوب برای تشخیص امراض تخم مانند *Alternaria, Ascochyta, Bipolaris, Botryodiplodia, Botrytis, Cercospora, Cladosporium, Colletotrichum, Curvularia, Drechslera, Fusarium, Macrophomina, Myrothecium, Phoma, Phomopsis, Rhizoctonia,* Sclerotinia و غیره میباشد.

تمام تخم های بذری غله جات، سبزیجات، نباتات پلیدار، نباتات زینتی و تخم های بذری نباتات جنگلی توسط این میتود تحت آزمایش قرار میگیرد. اکثر لابراتوارهای صحت تخم های بذری از این طریقه بخاطر تشخیص امراض تخم در یک انبار استفاده میکند.

وسایل مورد ضرورت:

1. اطاق کشت مجهز با آله کنترول کننده درجه حرارت که مجهز یا نصب با نیول ها که شعاع بنفش یا روشنی معمولی منتشر کرده که روشنی مصنوعی روز را مهیا میسازد.
2. مایکروسکوپ مرکب قدرت بزرگنمائی تا 400X
3. استیرو مایکروسکوپ دارای قدرت بزرگنمائی حد اقل تا 50X دارای دو لمپ.
4. پتری دیش های پلاستیکی یا شیشه یی با قطر 9 Cm باشد.
5. کاغذ فلتر با قطر 9 Cm که ظرفیت جذب آب بیشتر را داشته باشد (3 لایه کاغذ جاذب که تقریبا 40 سی سی آب را باید جذب کرده باشد).
6. بطنوس برای انتقال یا گذاشتن پتری دیش ها.
7. بیکر.
8. فورسپ یا پنس.

9. سلاید و پوش سلاید.
10. ماسک.
11. آب مقطر.
12. لامپ الکولی.
13. مارکر یا پنس مداد.
14. قلم.
15. سوزن.

پروسیجر میتود آزمایش کشت:

- طریقه کاغذ جاذب یکی از طریقه های کشت است جایی که تخم ها بالای کاغذ فلتر که خوب آب را جذب کرده باشد گذاشته میشود. مدت 7 روز در درجه حرارت 22-24 درجه سانتیگرید بطور متناوب 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تارکی گذاشته شود.
- بعد از انکبیشن، فنجای بالای هر تخم رشد نموده و تحت استیرو مایکروسکوپ با قدرت بزگنمائی متفاوت تشخیص میشود.
- تشخیص فنجای به اساس رشد و نمو بالای تخم خصوصیات نمویی و مارفلوجیکی ساختمان های تکثری، سپورها، کونیدیا تحت مایکروسکوپ مشاهده میشود.

تهیه نمودن پتری دیش ها:

بالای میزکاری پاک، تعداد مورد ضرورت پتری دیش ها بخاطر کشت تخم تهیه گردد. تعداد تخم های که در پتری دیش ها کشت میشود نظر به نوع تخم فرق میکند.

- نمبر و تاریخ تجزیه نمونه تحت آزمایش باید بالای هر پتری دیش نوشته شود.
- به تعداد 3 دانه کاغذ فلتر مرطوب در داخل هر پتری دیش گذاشته شود.
- کاغذ های فلتر در آب مقطر گذاشته زمانیکه کاملا تر شود به قسمت پائین پتری دیش انتقال داده شود.

نمونه گیری:

در لابراتوار، تنها یک مقدار کم تخم بذری از انبار تخم مورد معاینه قرار میگیرد این بسیار با اهمیت است. یک طرح درست نمونه اساسا به ترتیب نتائج یکسان، دقیق کمک میکند. نمونه گیری غلط یا ناقص میتواند نتائج ازمایش به اشتباه بیاندازد. مطابق طرزالعمل ایستا برای آزمایش صحت تخم، کدام قاعده ثابت راجع به تعداد تخم ها وجود ندارد که باید هر نمونه مورد آزمایش قرار گیرد. بطور عموم، این تعداد تخم از آزمایش جوانه زنی اقتباس شده است.

شمارش تعداد تخم ها:

تعداد تخم ها همرای کف گیر شمارش میشود. مطمئن شوید که انتخاب تخم در جریان شمارش صورت نگیرد. زمانیکه 5 دانه تخم در یک وقت شمارش میشود شمارش را آسانتر میسازد، تخم های جداشده و بعدا باهم یکجا شود و بعدا گروپ 10 یا 25 تخم تشکیل شود.

چیدن تخم ها در پتری دیش ها:

در پتری دیش های که قبلا آماده شده تخمها بالای کاغذ جاذب مرطوب چیده شود. تجزیه کننده باید مطمئن شود که تخم ها از یکدیگر مسافه مساوی داشته باشند. اگر تخم ها مطابق دوره عقربه ساعت چیده شود کار را آسان میسازد. بخصوص به همان اندازه وقتیکه بیشتر از 10 تخم در هر پتری دیش گذاشته شود مثال 25، نخست 15 تخم در دور بیرونی، 9 تخم در دوره وسطی و 1 تخم در مرکز چیده شود. زمانیکه تخم ها در قطارها چیده شود، شمارش فنجای در آخر معاینه مشکل میشود. در صورتیکه تخم ها بزرگ باشد مانند باقلی، سایبین، نخود و غیره 10 دانه تخم در یک پلیت چیده شود 1 تخم در مرکز و 9 دانه تخم در دوره بیرونی گذاشته شود.

گذاشتن پتری دیش ها در محیط مناسب یا رشد:

تمام پتری دیش های کشت شده در یک پطنوس گذاشته شود. مراقبت جدی باید صورت گیرد زمانیکه پتری دیش ها در پطنوس گذاشته میشود وبه اطاق رشد انتقال میشود. بنابرین تخم های چیده شده نه باید از جای اصلی اش بی جای شود. پتری دیش ها برای مدت 7 روز در اطاق رشد در درجه حرارت 22-24 سانتی گرید، مجهز با تایمر کنترول نزدیک روشنی در 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تارکی گذاشته شود. منبع روشنی نزدیک روشنی ماورای بنفش توسط تیوپ های سیاه روشن تهیه میشود. روشنی باید توسط دوتیوپ که به شکل افقی قرار داشته، 20 سانتی متر از یکدیگر فاصله داشته و مسافه میان نیول ها و پتری دیش ها 40 سانتی متر باشد تامین میشود. روشنی عموما تولید سپور ها را زیاد میسازد. تولید زیاد سپورها ما را در تشخیص فنجای ما را کمک میکند.

معاینه تخم های کشت شده:

بعد از انکبیشن، پتری دیش ها در محل معاینه برده شود.

- هر تخم باید تحت استیرومایکروسکوپ معاینه شود معاینه باید بطور مسلسل برا انداخته شود، یک خط از مرکز پتری دیش به لبه آن توسط پنسل رسم شود که میتواند بالای کاغذ مرطوب نوشته شود. اولین تخم که تحت معاینه قرار میگیرد در طرف راست خط در دوره بیرونی قرار دارد. یک مرتبه از طریق معاینه تخم اولی تکمیل شد پتری دیش خلاف جهت عقربه ساعت دور داده شود هنگامیکه تمرکز است. همین پروسیجر در حال حرکت از یک تخم به دیگر تخم تعقیب میشود. در یک ظرف که 25 تخم چیده شده باشد. نخست دوره بیرونی تمام تخم ها معاینه آن تکمیل شود، به تعقیب آن دوره داخلی در عین ترتیب و بلاخره تخم که در مرکز پلیت قرار دارد.

- خصوصیات نموئی هر فنگس مطالعه شود، طریقه که فنگس بالای آن رشد کرده نموده باشد تحت قدرت بزگنمائی مختلف استیرو مایکروسکوپ. خصوصیات نموئی باید در کتابچه یاداشت گردد.
- از ساختمان های تکثری هر فنگس سلاید آماده شود، طوریکه فنگس بالای تخم رشد کرده تحت مایکروسکوپ مرکب با مشوره مایکولوجست باتجربه متخصص پتالوژی یا آزمایش کننده صحت تخم تشخیص نماید.
- یک مرتبه فنگس مزکور به اساس نوع تحت مایکروسکوپ مرکب تشخیص گردید. تخم مصاب توسط نوشتن مخفف همان فنگس بالای کاغذ مرطوب نشانی شود.
- تشخیص فنجای به اساس عادت نموئی، کالونی و سیستم شاخه آن صورت میگیرد. تشخیص فنگس آسان تر است زمانیکه رشد خوب بالای تخم مصاب کرده باشد.
- به اندک تجربه تعداد زیاد فنجای میتواند تشخیص شود توسط مشاهده عادت نموئی.
- شمارش نمائید فنجایی مختلف را در هر پتری دیش و بالای هر کدام آن مخففات بنویسید.
- شمارش هر فنگس از هر پتری دیش در ورق ثبت فورا بعد از معاینه پتری دیش یاداشت گردد.
- نتائج نهائی آزمایش کاغذ جاذب بعدا باید در راپور صحت تخم داخل شود یا درج شود. نتائج در 16 تکرار برای تخم های کوچک و 28 تکرار برای تخم های بزرگ.

سفارش میشود که معلومات ذیل به حسب ملاحظات جمع آوری گردد:

- استعمال تخم ها توسط رشد قوی فنجای باعث از بین رفتن جوانه زنی و فاسد شدن تخم میشود.
- علایم در ریشه ها (کم رنگ شده و فاسد شدن).
- علایم در مشیمه ها، کولیپتایل، هایپوکوتایل و برگ ها.
- مرگ نهالی ها
- موجودیت فریکونسی سپروفایت ها

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش کاغذ جاذب استندرد توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

$$\text{فیصدی مصابیت} = \frac{\text{تعداد تخم های مصاب}}{\text{تعداد تخم های تحت آزمایش}} \times 100$$

مواجه شدن به مشکلات:

بعضی اوقات در جریان انکبیشن سرپوش پتری دیش ها باز میشود. این زمانی واقع میشود که از پتری دیش های پلاستیکی استفاده شود. پتری دیش های پلاستیکی نسبت به شیشئی سبک است زمانیکه توسط جوانه ها در حال رشد به شدت فشار وارد میشود. سرانجام باز شدن یا سوراخ شدن پتری دیش ها باعث خشک شدن کاغذ جاذب میشود. کاغذ فلتر

خشک شده رطوبت کافی که برای رشد و انکشاف فنجایی ضرور است مهیا ساخته نمیتواند که تاثیر بدی بالای رشد و انکشاف فنجای میگزارد. بخاطر فایق آمدن به این مشکل از میتود دیپ فریز استفاده شود.

میتود دیپ فریز برای تشخیش امراض تخم های بذری:

تمام مواد و روش های که در این طریقه ضرورت است مشابه به میتود کاغذ جاذب استندرد به استثنای به اندازه در معرض درجه حرارت پائین قرار دادن و این یک ضرورت اضافی است. بعد از گذاشتن تخم ها در پتری دیش ها طوریکه در میتود استندرد بلاتر ذکر گردید، نخست پتری دیش ها در ماشین انکبیتور در درجه حرارت 1- 4 درجه سانتیگرید به مدت 48 ساعت نگهداری شود و دوباره آورده شود به 20- درجه سانتیگرید برای 24 ساعت و پس به درجه حرارت 18-22 درجه سانتیگرید برای مدت 3- 4 روز 12 ساعت در تاریکی و 12 ساعت در روشنی گذاشته شود.

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش دیپ فریز توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

تعداد تخم های مصاب
فیصدی مصابیت = ---------- X 100
تعداد تخم های تحت آزمایش

نواقص:

رشد بیش از حد سپروفایت ها مثال *Aspergillus, Pencillium Cladosporium* بسیار معمول است بالای تخم های که در درجه حرارت پائین به مدت 24 ساعت نگهداری میشود و به شدت جریان معاینه تخم ها متاثر میسازد. پوسیدگی تخم ها توسط باکتریا از تخم های پوسیده بوی خراب را منتشر کرده که برای انجام کار همرای فنجایی دومی مانند فیوزاریم که تمام آن از تخم های کشت شده ناپدید میشود یا نموی نارمل آن تغیر کرده و اندازه شناسائی تحت استیرو مایکروسکوپ تقریبا ناممکن میسازد. از این رو، پیشنهاد میشود که مدت 8 ساعت در یخ ذدگی در درجه حرارت 20- درجه سانتیگرید گذاشته شود. سپورهای فنجای تحت مایکروسکوپ مرکب متفاوت دیده شده و تشخیص سپیشز را مشکل میسازد. بمنظور جلوگیری از ملوث شدن با بکتریا میتوان انتی بایوتیک ها در اب مقطر استعمال نمود.

فواید:

فنجای مانند *Fusarium* و *Septoria* در غله جات، *Phoma* در لبلبو و *Pyrenophora graminea* و *P. teres* در جو توسط این طریقه میتواند تشخیص شود. تخم های مرده منحیث مواد طبعی برای رشد فنجای عمل میکند.

میتود 2, 4-D

در جریان انکبیشن، تخم ها جوانه زده و در میتود کاغذ جاذب استندرد مانع مشاهدات میشود. بخاطر غالب آمدن برین از میتود 2, 4-D استفاده شود تا تشخیص مایکوفلورا تخم را آسان سازد.

طوریکه این طریقه پروسه جوانه زنی تخم ها را به تعویق می اندازد. این میتود برای اولین بار در سال 1950 توسط عالم بنام Hugborg و دیگران این تست برای تشخیص امراض *Colletotricum lindimuthianum* در تخم های لوبیا مورد ازمایش قرار گرفت. 2, 4-D جوانه زنی تخم و رشد جوانه ها را به تعویق می اندازد و معاینه تخم ها را زود آسان میسازد.

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش 2, 4-D توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

تعداد تخم های مصاب
فیصدی مصابیت = ---------- X 100
تعداد تخم های تحت آزمایش

فواید:

فنجایی مشخص که توسط این طریقه آزمایش میشود شمارش بالا میدهد.

نواقص:

مواد کیمیاوی 2, 4-D تاثیر سوه دارد.

میتود اگر پلیت:

در این میتود، به طور عموم تخم های ضد عفونی شده و در اگر میدیم کشت میشود و تخم های کشت شده به مدت 5-7 روز در درجه حرارت 22- 25 سانتیگرید برای 12 ساعت در روشنی و 12 ساعت در تاریکی قرار داده شود. در آخر دوره انکبیشن، فنجای همرای تخم بالای اگر میدیم معاینه و تشخیص میشود. تشخیص آنها به اساس خصوصیات کالونی و مارفولوژی ساختمان های تحت مایکروسکوپ مشاهده میشود.

تهیه میدیا و محلول سودیم هایپوکلورایذ:

محلول سودیم هایپوکلورایذ بخاطر معامله تخم با مواد کیمیاوی میتواند از کلورین یک فیصده رقیق تهیه میشود. از فورمول ذیل بخاطر تهیه محلول سودیم هایپوکلورایذ استفاده میشود.

بخاطر تهیه یک لیتر محلول سودیم هایپوکلورایذ از محلول اصلی رقیق که حاوی کلورین 12 فیصده باشد.

$$V_{Stock} = V_{Final} \times C_{Final} / C_{Stock}$$

$$V_{Stock} = 1L \times 1/ 12 = 0.083$$

از این رو، 83 ملی لیتر از محلول رقیق 12 فیصده کلورین موجود به 917 ملی لیتر آب برای تهیه این مواد اضافه میشود.

تهیه میدیم:

مقدار اگر میدیم که بخاطر آزمایش 400 دانه تخم ضرور است وزن نمائید. مقدار اگر نظر به تعداد تخم ها در هر پتری دیش گذاشته شود. (تخم های سایز کوچک 10 دانه در یک پتری دیش مثال برنج و تخم سایز بزرگ در یک پتری دیش مثال لوبیا و سایبین).

مواد ضروری برای تهیه 1 لیتر (PDA) میدیم:

- کچالو میده شده 200 گرام
- پودر دکستروز 20 گرام
- پودر اگر 20 گرام
- آب مقطر 1 لیتر
- ماده کیمیاوی سترپتومایسین سلفیت 1 گرام

ماده کیمیاوی Streptomycin sulphate ذهری است در وقت وزن نمودن و انداختن در میدیم احتیاط صورت گیرد.

- ❖ اجزای ترکیبی در یک ظرف مناسب وزن گردد
- ❖ مقدار آب مقطر مورد ضرورت اضافه نمائید
- ❖ برای 15 دقیقه در درجه حرارت 121 سانتیگرید تحت فشار 15lb psi اتوکلاو نمائید.
- ❖ بعد از تعقیم نمودن محلول را بگزارید تا تقریبا 50 درجه سانتیگرید سرد شود
- ❖ 15-22 ملی لیتر اگر میدیم ذوب شده را در پتری دیش 9 سانتی متر به اندازید و بگزارید تا سرد شود.
- ❖ پتری پلیت ها را در درجه اطاق در داخل کابین با 4 درجه سانتیگرید گذاشته شود.

انداختن میدیم در پتری دیش ها:

میدیم را در پتری دیش های تعقیم شده تقریبا 15 ملی لیتر در هر پتری دیش ها انداخته میشود، این عمل باید در شرایط لابراتوار در داخل جعبه لیمینار صورت گیرد. قبل از گذاشتن تخم ها پتری پلیت های را بگزارید تا کاملا سخت شده باشد.

کشت تخم ها بالای اگر میدیم:

پروسه باید مطابق ازمایش کاغذ جاذب اجرا گردد.

گذاشتن تخم ها:

تخم های چیده شده را طوریکه قبلا در طریقه کاغذ جاذب تشریح گردید. شرایط انکبیشن، درجه حرارت، دوران روشنی و تارکی و انکبیشن باید مطابق میل رشد و انکشاف پتوجن باشد.

معاینه کالونی های فنجای:

- در طریقه اگر پلیت بیشتر از یک نوع کالونی های فنگس تولید میشود. تعداد آنها شاید 3،4،5 یا حتی زیاد باشد این برمیخورد به سطح مصابیت تخم ها که مصاب شده اند.
- تجزیه کننده نخست باید کالونی فنگس که مکررا در پتری پلیت موجود است مشخص کند، بعدا کالونی دوم که معمول باشد، سوم که معمول است، دیگر بعد از آن تشخیص کالونی های مختلف توسط قوه دید تحت استیرومایکروسکوپ معاینه شود.
- یاداشت نمائید که چطور کالونی ها ظاهر میشود زمانیکه توسط چشم هردو طرف آن مشاهده شد مثال رنگ کالونی، اندازه کالونی، نوع مایسلیم نرم، پنبه ای، فشرده. اطراف آن لشم، موج دار شکل رنگ ساختمان های تکثری و غیره.

یاداشت مصابیت:

تعداد فنجایی که تحت تحقیق قرار گرفته از هر ظرف در ورق کار و بلاخره در راپور صحت تخم یاداشت گردد.

دریافت فیصدی مصابیت در آزمایش اگر پلیت توسط فورمول ذیل محاسبه میگردد:

$$\text{فیصدی مصابیت} = \frac{\text{تعداد تخم های مصاب}}{\text{تعداد تخم های تحت آزمایش}} \times 100$$

فواید:

طریقه آگر پلیت معلومات موثر را برای تشخیص سریع مصابیت تخم ار مهیا میسازد. وقتیکه تجزیه کننده با خواص کالونی های فنگس اشنا شود؛ اگر پلیت یک تخنیک موثر برای تشخیص سریع مصابیت خاص تخم میباشد.

نواقص:

فنجایی که رشد بطی دارد شاید تحت تاثیر یا پوشش سپروفایت ها یا فنجایی پرازیتی که دارای رشد سریع است قرار میگیرد. اگرچه این آسان است برای تجزیه کننده به آسانی یک فنگس را به اساس خصوصیات رشد کالونی بالای میدیم تشخیص کند اما با تغیر در میدیم باعث تغیر در خصوصیت کالونی نیز میشود. اگر پلیت میتود غیر اقتصادی است از این رو این میتود تنها باید زمانی استفاده شود که فنجای به آسانی توسط طریقه کاغذ جاذب استفاده نشود.

آزمایش علایم جوانه ها:

بعضی فنجایی تخم زی قابلیت حمله بالای تخم را دارند تخم های جوانه نزده در نتیجه باعث پوسیدگی تخم ها میشود و علایم بالای جوانه های جوان ظاهر میشود یا حتی باعث از بین رفتن نهالی های مصاب میشود. این عوامل زمانی دیده میشود اگر تخم ها در میدیم مناسب کشت شود و جوانه های کشت شده تحت شرایط محیطی که همچو عوامل را حمایت میکند. بعضی پتوجن های انواع فنجای مانند *Alternaria, Ascochyta, Biploris, Fusarium, Drechslera, Colletotrichum, Macrophominia and Pyricularia* باعث امراض جوانه ها میشود.

یاداشت نمودن علایم مرض در جوانه ها تدابیر بخاطر موجودیت مصابیت در تخم گرفته میشود. بعضی اوقات علایم نهالی ها در میتود های کاغذ جاذب و اگرپلیت دیده میشود. میدیم که در این دو طریقه استفاده میشود مصنوعی است و در نتیجه انکشاف علایم را شاید محدود سازد. یک رویکرد برای ایجاد محیط طبعی وقتی بدست میاید که تخم ها در خاک، ریگ، جغل و مواد مشابه تعقیم شده کشت شود. تخم های مصاب، تحت شرایط مطلوب درجه حرارت، روشنی و رطوبت شاید علایم مشابه مزرعه را تولید نماید.

میتود آزمایش اگر تیوب:

میتود آزمایش اگر تیوپ بخاطر مطالعه علایم مشخص جوانه ها که از تخم های مصاب بمیان میآید استفاده میشود. این میتود به اساس علایم که توسط جوانه تولید میشود ما را در تشخیص پتوجن ها کمک میکند.

این میتود توسط عالم بنام Khare و دیگران در سال 1977 بخاطر تشخیص مرض Septoria nodorum در تخم های گندم مورد استفاده قرار گرفت که طور ذیل انجام میشود:

- مقدار آب و اگر باید نظر به ضرورت تهیه گردد.
- پودر اگر در آب گرم علاوه شود و توسط یک میله تا وقت شور داده شود که تمام محتویات آن کاملا حل گردد.
- به مقدار ۱۰ ملی لتر واتر آگر در هر تست تیوب انداخته شود.
- بعد از ان به منظور تعقیم نمودن در اتوکلف برای مدت تعین شده تعقیم گردد.
- بعد از تعقیم تیوپ ها به شکل شیب دار بالای میز به زاویه 30 درجه گذاشته شود.
- بعد از جامد شدن اگر میدیم، یک تخم در هر تیوب کشت گردد .

انکبیشن

تیوب ها در درجه حرارت 18-22 سانتی گرید به مدت 4 روز 12 ساعت در روشنی و 12 ساعت در تارکی گذاشته شود. کاغذ المونیمی یا پلگ پخته ای زمانیکه جوانه ها رشد و به آنها تماس نماید دور ساخته شود.

معاینه و یادداشت نمودن:

- تیوب ها معاینه و به سه گروپ تقسیم شود: 1- جوانه های صحت مند و سالم، 2- جوانه های که از خود علایم را نشان دهد، 3- تخم های که جوانه نزده.
- از علایم مختلف به جزیات آن نوت تهیه گردد. ساحات متاثر شده از اسپرولیشن فنگس را تحت استیرو مایکروسکوپ معاینه گردد. فنگس که علایم مشخص را از خود نشان دهد تشخیص شود.هر نهالی که علایم امراض را نشان میدهد باید در شمارش و در فورم تجزیه لابراتواری ذکر گردد.
- تیوب ها که درآن تخم ها جوانه نزده باید تحت استیرو مایکروسکوپ معاینه گردد. تخم های مصاب با فنگس معاینه شود و آنهای که با فنجای مصاب نشده شمارش شود و درج راپور گردد.

فواید

آزمایش علایم جوانه ها بسیار یک تست آسان و قابل تطبیق میباشد.

نواقص

این آزمایش فقط برای عملکرد ابتدائی انبار تخم تحت شرایط لابراتوار معلومات میدهد. این ازمایش یک اندازه مصارف ضرورت دارد.

آزمایش رشد و نمو (Growing on Test):

جوانه زنی در گلخانه یکی از آزمایش مهم برای ارزیابی قابلیت زیستن تخم ها میباشد و موجودیت و عدم موجودیت پتوجن های که توسط آن انتقال میشود تشخیص و شناسائی میشود. این آزمایش بطور عموم بخاطر تشخیص پتوجن های تخم زی بکتریائی و ویروسی اجرا میشود.

پروسیجر

- تخم ها شمارش و با فنگس کش ها معامله شود.
- گلدان ها را از خاک پر نموده و از آب اشباع شود.
- تخم ها را بالای خاک مرطوب کشت نموده و توسط خاک پوشانیده شود.
- از دادن آب اضافی جلوگیری شود.
- گلدان های کشت شده را در شرایط آزاد تحت نظر وکتورها گذاشته شود.
- بعد از 14- 20 روز علایم آن را مشاهده و یاداشت نمائید.

فواید

فواید عمده این میتود امکان رشد علایم را در نبات نشان میدهد.

نواقص

این ازمایش اتکا بر علام دارد در صورتیکه بعضی از ویروس ها علام را نشان نمیدهد. اجرا ازمایشات به منظور تشخیص امراض ویروسی وسایل بسیار پیشرفته را نیاز دارد.

فصل سوم

تشخیص پتوجن های تخم زی

طریقه تشخیص مرض سیاقاق جزئی یا کرنل بانت

میزبان: گندم

پتوجن: *Tilletia indica or Neovossia indica*

میتود:

1. تفتیش مزرعه
2. معاینه توسط قوه دید
3. واشنگ تست
4. طریقه سودیم هایدروکساید

تفتیش مزرعه

پروسیجر:

تفتیش مزرعه بخاطر تشخیص خوشه های مصاب این مرض بین مرحله سرکشیدن و رفع حاصل صورت گیرد. تخم های مصاب به سیاقاق جزئی در جریان تفتیش مزرعه تشخیص شد باید تحت مایکروسکوپ بخاطر خصوصیات تیلیوسپور های *Tilletia indica* مشاهده گردد.

تخم های مصاب به سیاقاق جزئی تحت مایکروسکوپ مشاهده شود تا برای خصوصیات سپورهای *Tilletia indica*، طوریکه متفاوت است از سپورهای دیکر سپیشیز های *Tilletia* که تا حدی علایم مشابه را از خود نشان میدهد.

معاینه تخم خشک

پروسیجر:

- 125 گرام نمونه کاری باید توسط قوه دید یا مگنیفایر به دقت معاینه شود.
- پتوجن *Tilletia indica* اکثرا قسمت جنین تخم را مصاب میسازد، احتمالا در خط کریز تخم انکشاف میکند، اما بالای اندوسپرم حمله نمیکند.
- مشاهده مستقیم توسط استیرومایکروسکوپ شاید در تشخیص تلیواسپورها موثر است.

واشنگ تست

پروسیجر:

- 400 دانه تخم از نمونه انتخاب شود در 8 تکرار در هر تکرار 50 دانه تخم در تست تیوپ ها که حاوی آب کافی باشد تا تخم توسط آب پوشانیده شود.
- برای مدت 10 دقیقه تیوپ ها در میکانیکل شیکر شور داده شود، بعدا به مدت 20 دقیقه در درجه 3000 در فی دقیقه سنتریفوج گردد. آب تانشین شده تحت مایکروسکوپ برای مشاهده تلیوسپورها مشاهده شود.

طریقه سودیم هایدروکساید

پروسیجر

- تخم ها در محلول ۲ فیصده سودیم هایدروکساید گذاشته شود، برای مدت 24 ساعت در شرایط اطاق نگهداری شود.
- بعد از 24 ساعت محلول فلتر شود.
- تخم ها بالای کاغذ جاذب هموار شود تا آب که بالای سطح تخم قرار دارد جذب گردد.
- تخم های توسط قوه دید با کمک برق دستی معاینه شود.
- تخم های که رنگ سیاه روشن را از خود نشان دهد جدا شود.

- تخم های جدا شده را بطور جداگانه بالای یک قطره آب مقطر فشارداده بخاطر مشاهده سپورهای سیاقاق تحت مایکروسکوپ مشاهده شود.
- تخم های که اسپور های فنگسی از آن جریان پیدا میکند منحیث تخم های مصاب به شمار میرود.
- نتائج آن به فیصدی گذارش داده میشود.

طریقه تشخیص مرض سیاقاق معمولی

میزبان: گندم

پتوجن: *Tilletia caries* and *Tilletia foetida*

میتود:

1. معاینه توسط قوه دید
2. واشنگ تست

معاینه تخم خشک

پروسیجر:

- 125 گرام نمونه کاری باید توسط قوه دید یا بزرگ کننده به دقت معاینه شود.
- کتله های سیاقاق کروی حاوی سپورهای سیاه رنگ *Tilletia caries* and *Tilletia foetida* که در پوست دانه قرار دارد.
- مشاهده مستقیم توسط استیرومایکروسکوپ شاید در تشخیص سپورها بسیار موثر میباشد.

واشنگ تست

پروسیجر:

- 400 دانه تخم از نمونه انتخاب شود در 8 تکرار در هر تکرار 50 دانه تخم در تست تیوپ ها که حاوی آب کافی باشد تا تخم توسط آب پوشانیده شود.
- برای مدت 10 دقیقه تیوپ ها در میکانیکل شیکر شور داده شود، بعدا به مدت 20 دقیقه در دوران 3000 فی دقیقه سنتریفوج گردد. آب تانشین شده تحت مایکروسکوپ تلیوسپورها مشاهده شود.

طریقه تشخیص مرض بلک پاینت

میزبان: گندم

پتوجن: *Alternaria triticina*

میتود: کلچر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. به صورت تصادفی 400 دانه تخم را انتخاب نمائید: 4 تکرار در هر تکرار آن 100 دانه تخم.
2. در صورتیکه تخم ها با مواد کیمیاوی معامله شده باشد بطور کامل با آب شسته شود.

3. تخم ها در محلول سودیم هایپوکلوراید به مدت یک دقیقه بخاطر تعقیم کردن گذاشته شود و بعدا سه مرتبه با آب مقطر شسته شود.
4. در شرایط تعقیم شده تخم ها تعقیم شده بالای میدیم PDA ، 25 دانه تخم در هر پتری دیش (قطر 9 سانتی متر) کشت شود.
5. پتری دیش های نمونه را در درجه حرارت 20-24 سانتی گرید در داخل انکبیتور یا شرایط اطاق به مدت یک هفته گذاشته شود. 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تارکی در روز مهیا گردد.
6. بعد از یک هفته پلیت ها بخاطر موجودیت ساختمان های تکثری مثلا کونیدیا و سپور ها تحت مایکروسکوپ مشاهده گردد.

طریقه تشخیص مرض بلایت خوشه ها

میزبان: گندم

پتوجن: *Fusarium semitectum*

میتود: کلچر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. به صورت تصادفی 400 دانه تخم را انتخاب نمائید: 4 تکرار در هر تکرار آن 100 دانه تخم.
2. در صورتیکه تخم ها با مواد کیمیاوی معامله شده باشد بطور کامل با آب شسته شود.
3. تخم ها در محلول سودیم هایپوکلوراید به مدت یک دقیقه بخاطر تعقیم کردن گذاشته شود و بعدا سه مرتبه با آب مقطر شسته شود.
4. در شرایط تعقیم شده تخم ها تعقیم شده بالای میدیم PDA ، 25 دانه تخم در هر پتری دیش (قطر 9 سانتی متر) کشت شود.
5. پتری دیش های نمونه را در درجه حرارت 20-24 سانتی گرید در داخل انکبیتور یا شرایط اطاق به مدت یک هفته گذاشته شود. 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تارکی در روز مهیا گردد.
6. مایسلیم مورد شک بخاطر موجودیت مکرو و مایکرو کونیدیای فنگس *Fusarium semitectum* باید تحت معاینه قرار گیرد.

طریقه تشخیص مرض بلاچ گندم

میزبان: گندم

پتوجن: *Stagonospora nodorum Berk (syn Septoria nodorum Berk.)*

میتود: کلچر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. تخم ها در محلول کیمیاوی یک فیصده سودیم هایپوکلوراید برای مدت 10 دقیقه تعقیم شود.
2. 25 دانه تخم در هر پلیت کشت شود.
3. پلیت ها برای مدت 7 روز در 18- 22 درجه سانتی گرید در انکبیتور نگهداری شود.
4. کلچر باید بعد از هفت روز برای رشد بطی کالونی های مدور مایسلیم سفید یا کریمی توسط قوه دید معاینه گردد که تخم های مصاب را میپوشاند. با مرور زمان رنگ کالونی تاریک میشود.

طریقه تشخیص مرض سیاقاق عریان یا لوز اسمت

میزبان: گندم و جو

پتوجن: *Ustilago* spp.

میتود: شمارش امبریو

نمونه کاری: 200 – 240 گرام تخم

پروسیجر

تهیه نمونه

1. دو تکرار 100- 120 گرام تخم در هر تکرار باید استفاده گردد.

جدا نمودن جنین تخم

1. نمونه کاری را در یک لیتر محلول کیمیاوی 5 فیصده سودیم هایدروکساید که تازه تهیه شده باشد گذاشته شود و در 18 – 22 درجه سانتی گرید برای مدت 24 ساعت نگهداری شود.
2. بعد از تر نمودن، تمام نمونه باید در یک ظرف مناسب انداخته شود و در آب گرم شسته شود بخاطر جدا نمودن جنین، که معلوم میشود از پریکارپ نرم شده.
3. جنین را از جالی داری سوراخ های 1 ملی متر فلتر نموده. از جالی دیگر که سوراخ های بزرگ داشته باشد میتوانید توته های اندوسپرم و مواد اضافی را جمع نمود.
4. جنین تخم را در محلول کلایسیرول و آب انداخته شود تا جنین بطور واضع جدا شود.
5. جنین را در بیکر 75 ملی لیتر انتقال دهید که حاوی لکتوفینول بیدون اب باشد. وقتیکه بیکر به نقطه جوش رسید برای مدت ۳۰ ثانیه دیکر مانده شود تا امبریو به طور واضح مشاهده گردد.
6. جنین در گلایسیرول تازه و گرم بخاطر مشاهده نمودن انداخته شود.

معاینه نمودن

1. 1000 امبریو از هر تکرار به قدرت بزرگنمائی 16-25 X در موجودیت روشنایی مناسب برای خصوصیات مایسلیم طلائی نصواری *Ustilago nuda* معاینه گردد.

طریقه تشخیص مرض داغهای نصواری شالی

میزبان: برنج

پتوجن: *Drechslera oryzae*

میتود: کاغذ جاذب

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. 25 دانه تخم در هر پتری دیش که حاوی کاغذ جاذب مرطوب باشد کشت شود.
2. پلیت ها برای مدت هفت روز در 22 درجه سانتی گرید 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تاریکی مهیا گردد.
3. هر تخم در قدرت بذرگنمایی 12 – 50 برای کونیدیا *Drechslera oryzae* معاینه شود. کونیدیای فنگس مذکور بالای پوش تخم تولید میشود. مایسلیم خاکی روشن و نرم تمام قسمت های تخم میپوشاند. بلاخره فنگس تمام کاغذ جاذب را میپوشاند و کونیدیا تحت قدرت بزرگنمائی 200 X معاینه شود.

طریقه تشخیص مرض بلاست شالی

میزبان: برنج

پتوجن: *Magnaporthe grisea* or *Pyricularia oryzae*

میتود: کاغذ جاذب

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. بالای کاغذ جاذب مرطوب در پتری دیش ها در هر پتری دیش 25 دانه تخم کشت شود.
2. پلیت ها برای مدت 7 روز در 22 درجه سانتی گرید نزدیک نور ماوراء بنفش 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تارکی در روز گذاشته شود.

تشخیص مرض لکه های بنفش تخم سویابین

میزبان: سویابین

پتوجن: *Cercospora kikuchii*

میتود:

1. **اگر پلیت**

پروسیجر:

- تخم ها سطحی در محلول کیمیاوی 0.5 فیصده سودیم هایپوکلورایدبرای مدت 4 دقیقه تعقیم شود بعدا با آب مقطر شسته شود.
- تخم ها در پلیت های حاوی (PDA) میدیا کشت گردد.
- پلیت ها در 25 درجه سانتیگرید در تارکی به مدت 10 روز نگهداری شود.

2. **کاغذ جاذب**

پروسیجر:

- تخم ها سطحی در محلول کیمیاوی 1 فیصده سودیم هایپوکلوراید برای مدت 30 ثانیه تعقیم شود و بعدا با آب مقطر شسته شود.
- تخم ها در پلیت های که حاوی کاغذ جاذب مرطوب کشت شود و در 25 درجه سانتی گرید به مدت 10 روز در روشنی گذاشته شود.

طریقه تشخیص مرض پوسیدگی سیاه

میزبان: سویابین

پتوجن: *Macrophomina phaseolina*

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

میتود:

1. **معاینه توسط قوه دید**

پروسیجر:

- معاینه توسط قوه دید یا لینز دارای قدرت بزرگنمائی تخم های مصاب دارای خالک های سیاه متفاوت این لکه ها در پوست تخم مشاهده میشود. تخم های حاوی از علایم مرض بالای پوش تخم و اسکلیروشیا دارای رنگ سیاه فنگس در پوش تخم نشان میدهد. تخم های شدیدا مصاب کاملا رنگ سیاه را به خود اختیار میکند و تعداد زیاد مایکرو اسکلیروشیا در تخم های خشک به مشاهد میرسد. جوانه ها بالای کاغذ جاذب باعث مرگ جوانه ها قبل از ظهور میشود.

2. **طریقه کاغذ جاذب**

پروسیجر:

این پروسیجر برای تشخیص مرض تخم های بدون علایم مرض ما را کمک میکند.

- سه دانه کاغذ جاذب 9 سانتی متر در هر پتری پلیت کذاشته شود و همرای آب مقطر مرطوب شود.
- آب اضافی را دور شود.
- در شرایط لابراتوار 10 دانه تخم در هر پلیت با مسافه های مساوی کشت شود.
- پلیت ها برای مدت 7 روز 12 تاریکی و 12 ساعت روشنی در روز نگهداری شود.
- تخم ها تحت استیرو مایکروسکوپ دارای قدرت بزرگنمائی X30 و X40 برای رشد فنگس معاینه شود. رشد فنگس در سطح تخم با ساختمان های سیاه نصواری کوچک اسکلیروشیا بالای سطح تخم مشاهده میشود.

طریقه تشخیص مرض پوسیدگی ساقه سویابین

میزبان: سویابین

پتوجن: *Sclerotinia sclerotiorum*

میتود: اگر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. تخم ها را به شکل سطحی در محلول کیمیاوی 1.75 فیصده سودیم هایپوکلوراید برای مدت 30 ثانیه تعقیم شود.
2. تخم ها سه مرتبه با آب مقطر شسته شود.
3. تخم ها را در پلیت های حاوی (PDA) میدیا کشت و در 25 درجه سانتی گرید به مدت 10 روز نگهداری شود.
4. تخم ها را مایسلیم سفید فنگس بعد از 3، 5، و 7 روز پوشانیده برای رشد بیشتر کالونی در شمارش نهائی با هم فرق میشود.
5. شمارش آخری زمانی صورت میگیرد که تخم ها را مایسلیم سفید یا اسکلیروشیا بزرگ در مدت 10 روز میپوشاند.

طریقه تشخیص مرض پوموپسس بلایت بادنجان سیاه

میزبان: بادنجان سیاه

پتوجن: *Phomopsis vaxans*

میتود: کاغذ جاذب

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. سه دانه کاغذ جاذب در هر پتری دیش 9 سانتی متر گذاشته و همرای آب مقطر مرطوب میشود.
2. آب اضافی فلتر میشود.
3. در شرایط لابراتوار، تخم های تعقیم شده 25 دانه تخم در هر پلیت بالای کاغذ جاذب گذاشته شود.
4. به مدت 7 روز در 20-22 درجه سانتی گرید به 12 ساعت روشنی و 12 ساعت تاریکی نگهداری شود.
5. تخم ها تحت استیرو مایکروسکوپ دارای قدرت بزرگنمائی 6 – 60 X بخاطر رشد فنگس برای تشخیص پکنیدیا بالای سطح تخم معاینه میگردد.

طریقه تشخیص مرض پژمردگی پالک

میزبان: پالک

پتوجن: *Verticillium dahliae*

میتود: اگر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. 400 دانه تخم در ماده کیمیاوی سودیم هایپوکلوراید برای مدت 2 ½ دقیقه سطحی تعقیم شود.
2. بعدا تخم ها در ایتانول 70 فیصده برای مدت 2 دقیقه تر شود، بعدا با آب مقطر شسته شود.
3. در شرایط سترایل بالای واتر اگر گذاشته شود و برای مدت 7 روز در 20 درجه سانتیگرید در تاریکی نگهداری شود.
4. پلیت ها بخاطر موجودیت مایکروسکلروشیا، کونیدیا و هایفا تحت مایکروسکوپ معاینه گردد.

طریقه تشخیص مرض اسکوچایتا بلایت نخود

میزبان: نخود

پتوجن: *Ascochyta pisi*

میتود: اگر پلیت

اندازه نمونه: 400 دانه تخم

پروسیجر:

1. تخم ها به مدت 10 دقیقه در محلول کیمیاوی سودیم هایپوکلوراید تعقیم شود.
2. بعدا تخم ها به آب مقطر شسته شود.
3. 10 دانه تخم بالای اگر میدیم در هر پلیت گذاشته شود.
4. پلیت ها به مدت 7 روز در 18 – 22 درجه سانتی گرید در تارکی نگهداری شود.
5. بعد از 7 روز هر تخم توسط قوه دید معاینه شود بخاطر موجودیت مایسلیم رنگ سفید که تخم های مصاب را کاملا میپوشاند.

طریقه تشخیص مرض انترگنوز لوبیا

میزبان: لوبیا

پتوجن: *Colletotricum lindemuthianum*

میتود: کاغذ لوله

نمونه کاری: 400 دانه تخم

پروسیجر:

- تخم ها در محلول یک فیصده سودیم هایپوکلوراید به مدت 10 دقیقه گذاشته شود تا تعقیم شود.
- 50 دانه تخم در هر تکرار بالای کاغذ جاذب مرطوب دو لا 350× 450 ملی متر کشت شود. بالای تخم های کشت شده یک لا کاغذ جاذب گذاشته شود. بعدا لوله شود و در داخل پلاستیک بخاطر حفظ رطوبت نگهداری شود.
- به مدت 7 روز در 22 درجه سانتی گرید در تاریکی نگهداری شود.
- بعد از 7 روز معاینه شود. پوش تخم دور شود بخاطر معاینه کوتیلیدنس توسط قوه دید.

- بعد 7 روز معاینه نمائید. پوش تخم را دور کنید و توسط قوه دید بخاطر موجودیت لکه های سیاه دارای حلقه بارز پوشانیده شده است. هر نقطه بخاطر موجودیت ساختمان اسیروالی چک شود.
- این میتود در انبار که معامله با مواد کیمیاوی شده باشد متاثر میشود. آزمایش صحت تخم بالای نمونه های که با مواد کیمیاوی معامله شده باشد بطور عموم نتائج غیر موثق میدهد بخاطریکه مواد کیمیاوی رشد فنگس مذکور را مختل میازد.

فصل چهارم

فورمه های ازمایشات صحت تخم

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه معاینه تخم خشک

نمبر راجستر نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر	تاریخ معاینه: وزن نمونه: اندازه نمونه که آزمایش شده): تعداد تخم: مشاهدات توسط قوه دید: مشاهدات توسط مایکرواسکوپ: **فیصدی مصابیت = وزن یا تعداد تخم های مصاب / وزن یا تعداد تخم های تحت آزمایش X 100** ملاحظات:
نتایج	

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه شستشو

نمبر راجستر نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر نتایج	تاریخ تجزیه: وزن نمونه: اندازه نمونه که آزمایش شده: تعداد تخم: نام پتوجن آزمایش شده: عامل مرض موجود بوده یا نه: تعداد واحد های تکثری در فی گرام تخم: **تعداد سپورها در فی گرام تخم = N X V X 10.000 / W** ملاحظات:

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه سودیم هایدروکساید

نمبر آزمایش نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر	تاریخ تجزیه: اندازه نمونه که آزمایش شده: وزن نمونه: تعداد تخم: نام پتوجن آزمایش شده: عامل مرض موجود بوده یا خیر: تعداد تخم های مصاب: **فیصدی مصابیت = (تعداد تخم های مصاب / تعداد تخم های تحت آزمایش) X 100**
نتایج	ملاحظات:

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه شمارش امبریو

نمبر آزمایش نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر	طریقه آزمایش: تاریخ یاداشت: اندازه نمونه که آزمایش شده: وزن نمونه: تعداد تخم: شمارش امبریو: تعداد امبریو آزمایش شده : تعداد امبریو مصاب: فیصدی مصابیت امبریو: **مصابیت امبریو = (تعداد امبریوهای مصاب / تعداد ابریوهای تحت آزمایش) X 100**
نتایج	ملاحظات:

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه کاغذ جاذب و اگرپلیت

نمبر آزمایش نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر	طریقه آزمایش: تاریخ کشت: تاریخ مشاهدات: تعداد تخم آزمایش شده: تعداد تخم در هر تکرار: نام فنگس: فیصدی مصابیت: یاداشت: نمبر تکرار: 8 7 6 5 4 3 2 1 **فیصدی مصابیت = تعداد تخم های مصاب / تعداد تخم های تحت آزمایش X 100** ملاحظات:
نتایج	

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه کاغذ جاذب و اگر پلیت

نمبر راجستر		نبات	
طریقه آزمایش		ورایتی	
تاریخ آزمایش		تاریخ یاداشت	
تعداد تخم در هر پتریدیش		مجموعه تعداد تخم های تحت آزمایش	

نمبر پلیت فنگس	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	ملاحظات

فورمه آزمایش صحت تخم طریقه اگر تیوب، رشد و نمو و علایم جوانه ها

نمبر آزمایش نمونه ---------- نام علمی نبات ---------- نام معمولی نبات ---------- ورایتی ---------- تاریخ دریافت نمونه ---------- معالجه بذری شده یا خیر	طریقه آزمایش: تاریخ یاداشت: اندازه نمونه که آزمایش شده: وزن نمونه: تکرارها 4 3 2 1 تعداد تخم های آزمایش شده: ---------- تعداد تخم های که جوانه نزده: ---------- تعداد تخم های جوانه نزده همرای: ---------- تعداد جوانه ها ---------- علایم جوانه ها با ---------- علایم جوانه ها با پتوجن های دیگر ----------
نتایج	ملاحظات:

ترتیب کننده:

پوهنیار محبوب الله "ننگ"

رئیس تصدیق دهی تخمهای بذری

منظور کننده:

حمدالله "همدرد"

سرپرست معینت زراعت و مالداری