DOI: http://dx.doi.org/10.22092/ijmapr.2016.108079

دوماهنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۲، شماره ۵، صفحه ۸۳۲-۸۲۴ (۱۳۹۵)

بررسی القای پلی‌پلوئیدی در سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از طریق تیمار بذر با کلشی‌سین

سیامک ذیشان[۱]، رسول اصغری زکریا[۲*] و ناصر زارع[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

پست الکترونیک: r-asghari@uma.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۴ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۴

چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی یک‌ساله از خانواده آلاله است که دانه آن حاوی پروتئین، آلکالوئیدها، کینون‌ها، ساپونین و اسانس فرّار بوده و علیه برخی از باکتری‌ها و درمان بسیاری از بیماری‌ها بکار می‌رود. در این تحقیق القاء پلی‌پلوئیدی در گیاه سیاه‌دانه از طریق تیمار بذر با غلظت‌های ۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلشی‌سین در مدت زمان ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار بررسی شد. تعیین درصد گیاهان تتراپلوئید از طریق بررسی صفات مورفولوژیکی و مشاهدات کروموزومی انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های حاصل نشان داد که اثر غلظت کلشی‌سین، مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها بر زنده‌مانی گیاهان و درصد القاء تتراپلوئیدی معنی‌دار است. با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار، درصد جوانه‌زنی بذرها و زنده‌مانی گیاهان حاصل به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. کمترین تعداد گیاهان زنده مانده در غلظت ۰/۲٪ کلشی‌سین با زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت مشاهده شد. بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید القاء شده (۹/۹٪) در غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین با مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های ۰/۱٪ و ۰/۲٪ آن با همین زمان تیمار نداشت. البته گیاهان حاصل از تیمار با کلشی‌سین، ارتفاع بوته، فواصل میانگره، طول و عرض کپسول بیشتری نسبت به گیاهان دیپلوئید داشتند. علاوه‌بر این، آنها دارای روزنه‌های بزرگتر با تعداد کمتر در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بودند.

واژه‌های کلیدی: اتوپلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، القاء پلی‌پلوئیدی.

مقدمه

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از خانواده آلاله، گیاهیست با گل‌های سفید یا آبی رنگ و دانه‌های سفید شیری که در تماس با هوا سیاه رنگ می‌شوند (Salehi Surmaghi, 2008). تعداد کروموزوم‌های پایه در سیاه‌دانه x=۶ می‌باشد (Datta & Saha, 2003). مهمترین ترکیب‌های موجود در سیاه‌دانه، روغن‌های ثابت و فرّار، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها هستند. در سیاه‌دانه ۴۰-۳۰ درصد روغن، ۱/۵-۰/۵ درصد اسانس و قندهای مختلف وجود دارد. فلاونول تری گلیکوزیدها نیز در این گیاه یافت می‌شود (Hajhashemi *et al*., 2004). در اسانس فرّار این گیاه بیش از ۸۵٪ ترکیب‌های

مونوترپنوئیدی به همراه ترکیب هایی مانند پاراسیمن، سیس‌توجون، تیموکینون، آلفا-توجن، لونجی فولن، بتا-پینن، کارواکرول و آلفا-پینن وجود دارند. عصاره پلی‌فنلی سیاه‌دانه حاوی کوئرستین می‌باشد (Hajhashemi *et al.*, 2004). البته اثرات ضداکسایشی روغن و عصاره آبی سیاه‌دانه گزارش شده‌است (Burits & Bucar, 2000؛ Bayrak *et al.*, 2008). همچنین گزارش شده‌است که روغن سیاه‌دانه اثرات مطلوبی علیه سلول‌های سرطانی انسانی داشته (Ait Mbarek *et al.*, 2007) و عصاره سیاه دانه باعث غیرفعال شدن رشد سلول های سرطانی پستان می‌شود (Swamy & Tan, 2000).

گونه‌های پلی‌پلوئید اغلب فنوتیپ‌های جدیدی را مانند افزایش مقاومت به خشکی و تحمل تنش های زیستی و غیرزیستی و افزایش رشد نسبت به گونه های دیپلوئید نشان می‌دهند (Borgheei *et al.*, 2010). دستورزی در محتوای کروموزوم و اندازه ژنوم گونه ها به علت تأثیر آن در برخی از ویژگی های اکوفیزیولوژیکی، ابزاری توانمند در مطالعات گیاهی بوده و در تکامل ژنتیکی بسیاری از گیاهان مؤثر شناخته شده‌است (Ochatt *et al.*, 2011). در برنامه های اصلاحی یکی از روش های مهم برای افزایش تنوع ژنتیکی در گونه‌ها، القاء پلی‌پلوئیدی است (Soltis & Soltis, 2000).

موادی مانند کلشی‌سین و علف‌کش‌های ضد میکروتوبولی مانند اوریزالین، تری‌فلورالین و آمی پروفوزمتیل از بازدارنده های میتوزی هستند که بر میکروتوبول ها تأثیر می گذارند و باعث ایجاد پلی‌پلوئیدی مصنوعی می‌شوند (Wan *et al.*, 1991). دو برابر کردن تعداد کروموزوم با استفاده از کلشی سین به‌طور وسیع در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد، که در گیاهان پلی‌پلوئید، اغلب اندازه گل‌ها، برگ‌ها، میوه‌ها و بذر افزایش می‌یابد و باعث افزایش عملکرد و متابولیت‌های ثانویه گیاهی در گیاهان دارویی می‌شود (Dhawan & Lavania, 1996). پلی‌پلوئیدی می‌تواند در بزرگتر و ضخیم‌تر شدن برگ‌ها، بزرگ‌تر شدن گل‌آذین‌ها، تأخیر در گل و طولانی شدن دوره گلدهی، میوه‌های بزرگتر، آپومیکسی، افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و عملکرد مؤثر باشد (Shao *et al.*, 2003؛ Urwin *et al.*, 2007). این پژوهش برای بررسی امکان القاء پلی پلوئیدی در گیاه سیاه‌دانه با استفاده از تیمار بذر و مقایسه مورفولوژیکی و سیتولوژیکی گیاهان حاصل از القاء پلی‌پلوئیدی با گیاهان شاهد انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور غلظت کلشی‌سین (۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) و مدت زمان تیمار (۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت) با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. بذرهای سیاه‌دانه جمع‌آوری شده از اردبیل به مدت ۱۵ دقیقه با آب‌مقطر شستشو و بعد در داخل ظرف پتری حاوی غلظت‌های مختلف کلشی‌سین به مدت ۸، ۲۴ و ۴۸ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بذرهای تیمارشده هر یک در گلدان حاوی خاک زراعی، پیت و ماسه به نسبت یک سوم در گلخانه کشت داده شدند. گیاهان شاهد و تیمارشده با کلشی سین از لحاظ صفات مورفولوژیکی و تعداد روزنه در مراحل رشد و نمو مورد ارزیابی قرار گرفتند. صفاتی مانند ارتفاع بوته، میانگین ضخامت برگ و میانگین فواصل میانگره بعد از تکمیل مرحله گلدهی براساس میانگین حداقل ۲۵ بوته مختلف اندازه گیری شدند. بعد از برداشت کپسول های رسیده نیز طول و عرض کپسول، وزن خشک کپسول براساس میانگین ۵۰ نمونه و وزن ۱۰۰۰ دانه و حجم ۵۰ دانه براساس میانگین ۱۰ نمونه مختلف اندازه‌گیری شدند. در نهایت بذرهای تهیه شده از گیاهان انتخاب شده کشت شده و از نوک ریشه آنها برای مشاهدات کاریولوژیکی استفاده شد و از این طریق گیاهان پلی‌پلوئید بوجود آمده به‌طور دقیق تعیین شدند.

برای شمارش تعداد روزنه‌ها لایه فوقانی برگ با قشری نازک از لاک بی‌رنگ معمولی پوشانیده شد، پس

از خشک شدن، با استفاده از نوار چسب معمولی لایه فوق را برداشته و روی یک لام تمیز چسبانیده و با میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰x تعداد روزنه‌ها شمارش گردید (تعداد آنها در میلی‌متر مربع می‌باشد) (Cramer, 1999). برای شمارش تعداد کروموزوم براساس روش Aghayev (۱۹۹۸)، پیش‌تیمار نوک ریشه‌ها با کلشی‌سین ۰/۰۵٪ به‌مدت سه ساعت انجام گردید و بعد ریشه‌ها در محلول لویتسکی (نسبت ۱:۱ حجمی از فرمالدئید ۱۰٪ و اسید کرومیک ۱٪) به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی گراد تثبیت شدند. نرم کردن ریشه‌ها در هیدروکسید سدیم یک نرمال به مدت ۹ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انجام شد. رنگ‌آمیزی با محلول استوفریک هماتوکسیلین ۴٪ به مدت ۶ ساعت، تیمار نوک ریشه‌ها با آنزیم سیتاز به مدت ۳ ساعت و شمارش و عکس برداری کروموزوم‌ها با میکروسکوپ Nikon E200 با بزرگنمایی ۱۰۰x انجام گردید. تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین به روش حداقل میانگین مربعات (LSD) در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. تفاوت آماری در خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید از طریق آزمون t با استفاده نرم‌افزار SPSS انجام شد.

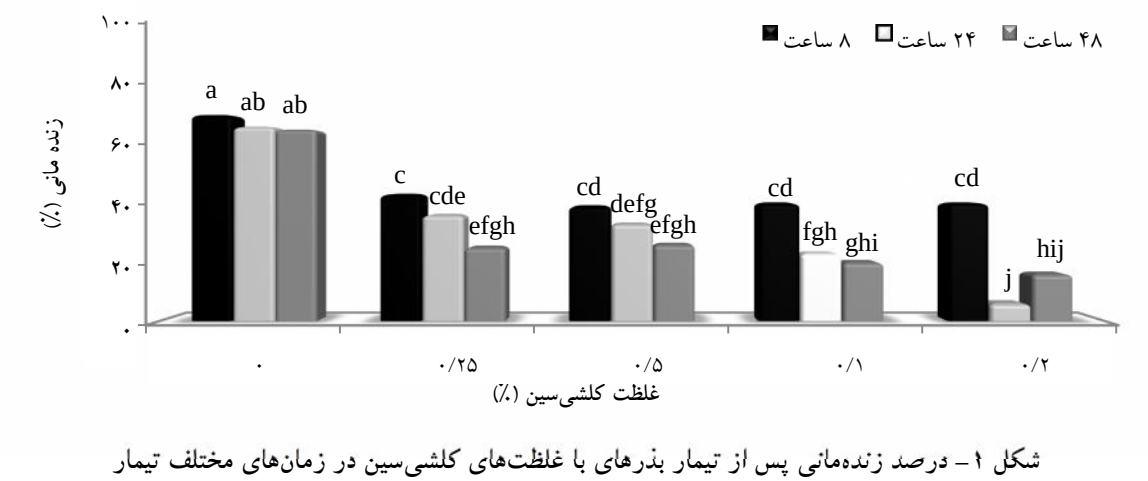
نتایج

تجزیه واریانس داده های حاصل (جدول ۱) نشان داد که اثر غلظت کلشی سین، مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها بر جوانه‌زنی بذرها و زنده‌مانی گیاهان و درصد القاء تتراپلوئیدی معنی دار است. در غلظت ۰/۰۲۵٪ کلشی سین با افزایش مدت زمان تیمار از درصد زنده‌مانی گیاهان کاسته شد. به‌طوری که از ۴۳٪ در مدت زمان تیمار ۸ ساعت، به ۲۵٪ در مدت زمان ۴۸ ساعت کاهش یافت. درصد زنده‌مانی در غلظت‌های ۰/۰۵٪ و ۰/۱٪ کلشی سین نیز از زمان ۸ تا ۴۸ ساعت روند کاهشی داشت (شکل ۱). کمترین تعداد گیاهان زنده مانده در غلظت ۰/۲٪ کلشی سین با زمان تیمار ۲۴ تا ۴۸ ساعت مشاهده شد. البته در مدت زمان تیمار ۸ ساعت تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف کلشی‌سین از لحاظ زنده‌مانی مشاهده نشد. بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید القاء شده در غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین با مدت زمان ۴۸ ساعت برابر ۹/۹٪ بدست آمد که تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های ۰/۱٪ و ۰/۲٪ آن با همین زمان تیمار نداشت. در کل در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلشی سین با مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بیشترین درصد گیاهان تتراپلوئید بدست آمد (شکل ۲). نمونه‌ای از تصاویر گستره‌های کروموزومی بدست آمده در گیاه دیپلوئید (شاهد) و گیاهان حاصل از تیمار با کلشی سین (تتراپلوئید) در شکل ۳ نشان داده شده‌است.

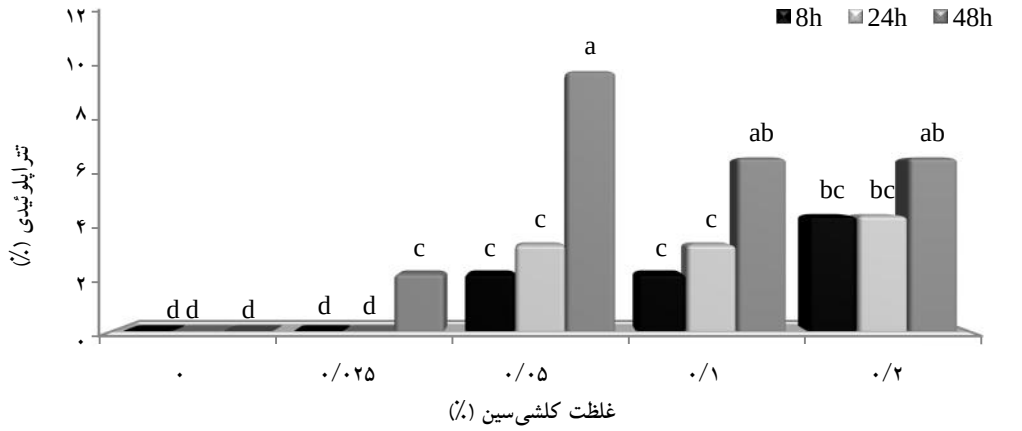
جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تیمار بذرهای سیاه‌دانه با غلظت‌های کلشی‌سین در زمان‌های مختلف تیمار

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		درصد زنده‌مانی	درصد پلی‌پلوئیدی
غلظت کلشی‌سین	۴	۰/۲۶ **	۰/۰۲۶ **
مدت زمان تیمار	۲	۰/۱۴ **	۰/۰۴۸ **
غلظت × مدت زمان	۸	۰/۰۲ **	۰/۰۰۳ *
خطا	۳۰	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات	-	۱۹/۷	۲۳/۶۶

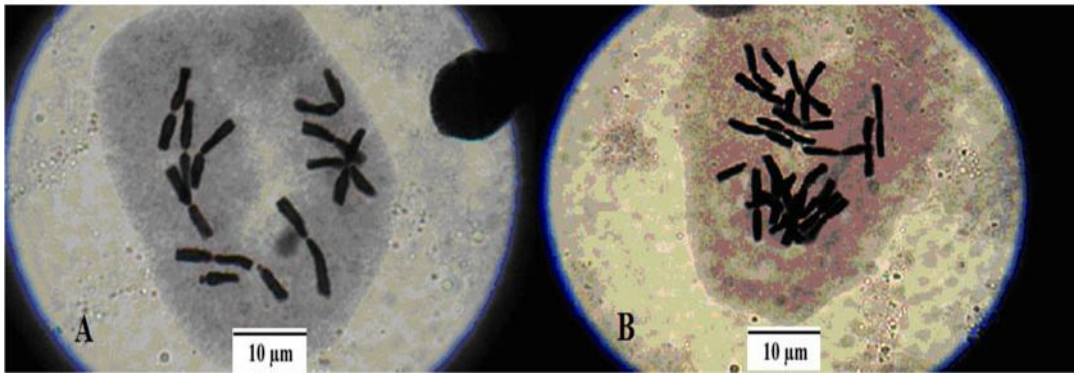
** و *: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪



شکل ۱ – درصد زنده‌مانی پس از تیمار بذرهای با غلظت‌های کلشی‌سین در زمان‌های مختلف تیمار



شکل ۲– درصد القاء تتراپلوئیدی پس از تیمار بذرهای با غلظت‌های کلشی‌سین در زمان‌های مختلف تیمار

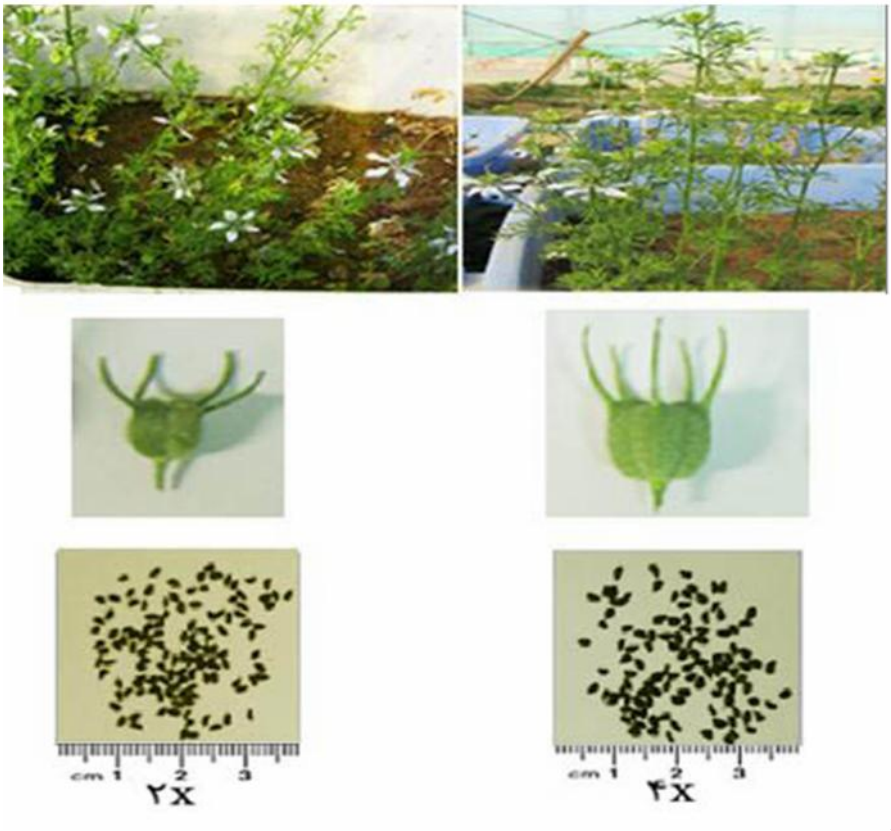


شکل ۳– تصویر گستره کروموزومی بدست آمده از نمونه‌های ریشه در بزرگنمایی ۱۰۰، (A) در گیاه دیپلوئید، (B) در گیاه تتراپلوئید حاصل از تیمار بذر با کلشی‌سین در غلظت ۰/۲٪ به مدت ۴۸ ساعت

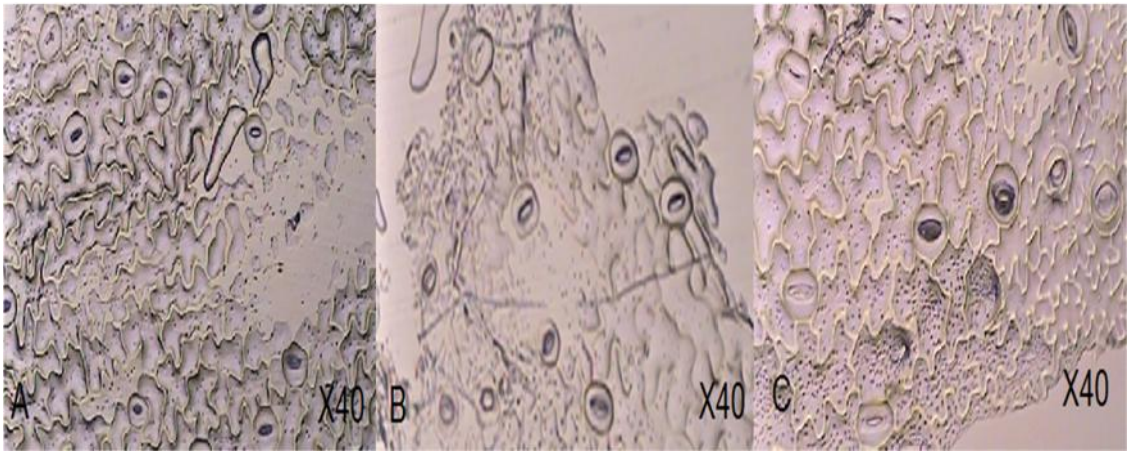
جدول ۲- میانگین برخی از ویژگی‌های گیاهان دیپلوئید و تتراپلوئید حاصل از تیمار بذرها با کلشی‌سین (میانگین و خطای استاندارد (SE) برای هر یک از صفات مشخص شده است)

ویژگی‌های مورد بررسی	گیاهان تتراپلوئید SE ± میانگین	گیاهان دیپلوئید SE ± میانگین	مقدار آزمون t
ارتفاع گیاه (cm)	۲۳/۲ ± ۱/۵	۱۵/۱ ± ۱/۱	-۴/۷۳ **
میانگین ضخامت برگ (mm)	۰/۱۸ ± ۰/۰۵	۰/۱۷ ± ۰/۰۱	-۰/۷ ns
تعداد روزنه روی برگ در (mm^2)	۱۳/۹ ± ۰/۹۴	۲۲/۲ ± ۱/۵۶	۵/۱ **
میانگین فواصل میانگره (cm)	۲/۲ ± ۰/۱۴	۱/۴ ± ۰/۱	-۴/۳ **
عرض کپسول (mm)	۷/۵ ± ۰/۴۷	۶/۱ ± ۰/۴	-۲/۳۷ *
طول کپسول (mm)	۸/۸ ± ۰/۶۲	۷/۰۴ ± ۰/۴۷	-۲/۳۳ *
وزن خشک کپسول (gr)	۰/۱۵ ± ۰/۰۱	۰/۰۹ ±۰/۰۰۳	-۴/۴۴ **
وزن ۱۰۰۰ دانه (gr)	۲/۶۴ ± ۰/۰۵	۲/۳۳ ±۰/۰۶	-۳/۶۳ **
حجم ۵۰ دانه (میکرولیتر)	۱۴۰ ± ۵ /۷۹	۱۰۹/۹۰± ۲/۸۴	-۴/۹۳ **

ns: غیرمعنی‌دار، * و **: به‌ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪



شکل ۴- به‌ترتیب از بالا به پایین: شکل ظاهری، اندازه کپسول و اندازه بذرها در گیاهان دیپلوئید (چپ) و تتراپلوئید (راست)



شکل ۵- اندازه روزنه‌ها در برگ. (A) گیاه دیپلوئید، (B و C) گیاه تتراپلوئید

از لحاظ تأثیر پلی‌پلوئیدی بر خصوصیات مورفولوژیکی، تعداد و اندازه روزنه‌ها مشاهده شد در صفاتی مانند ارتفاع بوته، طول و عرض کپسول‌ها، حجم دانه، میانگین فواصل میانگره، وزن و حجم دانه، گیاهان تیمارشده با کلشی‌سین نسبت به گیاهان دیپلوئید مقادیر بزرگتری داشتند، ولی بین گیاهان تتراپلوئید و دیپلوئید از لحاظ ضخامت برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین گیاهان تتراپلوئید نسبت به گیاهان دیپلوئید دارای تعداد روزنه کمتر و از نظر اندازه بزرگتر بودند (جدول ۲، شکل‌های۴ و ۵).

بحث

مرگ و میر گیاهچه‌های حاصل از بذرهای تیمار شده با کلشی‌سین با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار افزایش یافت. به‌طوری که کمترین درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی گیاهچه‌های حاصل در غلظت ۰/۲٪ کلشی‌سین با مدت زمان تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بدست آمد. Maamoun و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از ۰/۰۵٪ و ۰/۱٪ کلشی‌سین برای تیمار بذرهای سیاه‌دانه نشان دادند که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار از درصد جوانه‌زنی کاسته شد. همچنین Pande و Khetmalas (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که با افزایش غلظت و مدت زمان تیمار درصد جوانه‌زنی و زنده‌مانی کاهش می‌یابد. کلشی‌سین با ایجاد اختلال در تشکیل آنزیم‌های درگیر در فرایند جوانه‌زنی باعث کاهش درصد جوانه‌زنی می‌شود که یکی از اثرات فیزیولوژیکی ناشی از کلشی‌سین می‌باشد (Roychowdhury & Tah, 2011).

البته رابطه معکوس بین غلظت و زنده‌مانی بوته‌ها در گیاه خارشتر (Chen & Gao, 2007) و ریحان (Omidbaigi *et al*., 2010) تحت تیمار کلشی‌سین نیز گزارش شده است. Sarathum و همکاران (۲۰۱۰) نیز با مطالعه القاء پلی‌پلوئیدی در *Dendrobium scabrilingue* L. گزارش کردند اگرچه مدت زمان بالای تیمار با کلشی‌سین زنده‌مانی را کاهش می‌دهد ولی سبب افزایش درصد القاء پلی‌پلوئیدی می‌شود. به‌طوری که بیشترین درصد پلی‌پلوئیدی ایجاد شده در این گیاه در غلظت ۰/۱٪ کلشی‌سین و مدت زمان تیمار ۲۱ روز بدست آمد. در گیاه زینتی آلاله با استفاده از غلظت و مدت زمان‌های مختلف کلشی‌سین برای القاء تتراپلوئیدی مشاهده شد که با افزایش غلظت کلشی‌سین درصد پلی‌پلوئیدی افزایش یافت. به‌طوری که، در ۲۰۰ میکرومول کلشی‌سین با زمان ۱۶ ساعت، ۲۳/۳٪ پلی‌پلوئیدی حاصل شد (Dhooghe *et al*., 2009).

با افزایش غلظت کلشی‌سین و مدت زمان تیمار در گیاهان تتراپلوئید ایجاد شده، تعداد روزنه‌ها کمتر ولی اندازه آنها نسبت به دیپلوئیدها بزرگتر بود. اندازه گشودگی روزنه توسط طول سلول‌های محافظ روزنه تعیین می‌شود. معمولاً دیپلوئیدها نسبت به تتراپلوئیدهای ایجاد شده دارای روزنه‌های کوچکتری هستند (Hodgson *et al*., 2010). افزایش اندازه سلول‌های

روزنه در نتیجه القای پلی‌پلوئیدی در برخی از گونه‌های گیاهی مانند مارچوبه (Shiga *et al.*, 2009) و گندم (Aryavand *et al.*, 2003) و کاهش تعداد روزنه نیز در گونه‌های پلی‌پلوئید توت سفید (Chakraborti *et al.*, 1998) گزارش شده‌است. بررسی ویژگی‌های سلولی مانند اندازه‌گیری اندازه سلول، اندازه و تعداد سلول‌های محافظ روزنه در تشخیص پلی‌پلوئیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sybenga, 1992). اندازه سلول‌های نگهبان روزنه از فاکتورهای بسیار مناسب در شناسایی گیاهان تتراپلوئید از دیپلوئید می‌باشد، ولی فاکتور قابل اعتمادی، مخصوصاً در شناسایی نمونه‌های شیمر (مخلوط دیپلوئید و تتراپلوئید) از تتراپلوئید نمی‌باشد. افزایش اندازه سلولی، یکی از پیامدهای پلی‌پلوئیدی می‌باشد (Lavania, 2005). ویژگی‌های مورفولوژیک و ریختی مانند اندازه گل، طول و قطر ساقه، گل، بذر و غیره به‌عنوان روش شناسایی غیرمستقیم، روشی آسان، سریع و قابل استناد برای تشخیص پلی‌پلوئید ذکر شده ولی مستلزم گذشت زمان برای رشد گیاه بوده و قاطعیت کمتری نسبت به روش‌های مستقیم دارد (Sari *et al.*, 1999).

پلی‌پلوئیدی معمولاً منجر به ایجاد گیاهان درشت‌تر، با برگ‌های ضخیم و تیره‌تر می‌شود. به‌طوری که گزارش شده‌است گل‌های رز با کروموزوم‌های دو برابر شده تعداد گلبرگ‌های بیشتر، تعداد گرده زنده بیشتر، طول ساقه بلندتر و نسبت عرض به طول بیشتری در برگچه‌ها داشتند (Kermani *et al.*, 2003). Fang و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که گیاهان پلی‌پلوئید سوسن دارای برگ‌ها، ریشه‌ها و روزنه‌های درشت‌تر، ولی تعداد روزنه‌های کمتر در واحد سطح در مقایسه با گیاهان دیپلوئید بودند. Breuer و همکاران (۲۰۰۷) اعلام کردند که افزایش اندازه سلول حاصل از القای تتراپلوئیدی ممکن است یکی از مهمترین دلایل افزایش اندازه اندام گیاهی مانند برگ‌ها، گل‌ها، گلبرگ‌ها، کاسبرگ‌ها و دانه‌ها باشد. مطالعات مورفولوژیکی بدست آمده نشان داد که گیاهان حاصل از تیمار با کلشی‌سین از نظر ارتفاع بوته، فواصل میانگره، طول و عرض کپسول نسبت به گیاهان دیپلوئید مقادیر بیشتری داشتند. همچنین در گیاهان حاصل از تیمار با کلشی‌سین تعداد روزنه‌ها کاهش یافته و اندازه آنها بیشتر شد.

در کل، در این پژوهش بیشترین تعداد گیاهان تتراپلوئید در غلظت ۰/۰۵٪ کلشی‌سین با مدت زمان تیمار ۴۸ ساعت بدست آمد که برای دو برابر کردن سطح پلوئیدی در بذرهای سیاه‌دانه توصیه می‌شود. از آنجایی که القاء پلی‌پلوئیدی بر ترکیب‌های مؤثره گیاه تأثیرگذار است، پیشنهاد می‌شود که ترکیب‌های مؤثره سیاه‌دانه پس از القاء پلی‌پلوئیدی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

- Aghayev, Y.M., 1998. Advanced squash methods for investigation of plant chromosomes. Forth Iranian Congress on Crop Production and Breeding Sciences, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran, August 24-29: 1-20.
- Ait Mbarek, L., Ait Mouse, H., Elabbadi, N., Bensalah, M., Gamouh, A., Aboufatima, R., Benharref, A., Chait, A., Kamal, M., Dalal, A. and Zyad, A., 2007. Antitumorproperties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. Brazilian Journal of Medicine and Biology Research, 40(6): 839-847.
- Aryavand, A., Ehdaie, B., Tran, B. and Waines, J.G., 2003. Stomatal frequency and size differentiate ploidy levels in *Aegilops neglecta*. Genetic Resources and Crop Evolution, 50: 175-182.
- Bayrak, O., Bavbek, N., Karatas, O.F., Bayrak, R., Catal, F., Cimentepe, E., Akbas, A., Yildirim, E., Unal, D. and Akcay, A., 2008. *Nigella sativa* protects against ischaemia reperfusion injury in rat kidneys. Nephrology Dialysis Transplantation, 22: 2206-2212.
- Borgheei, S.F., Sarikhani, H., Chaichi, M. and Kashi, A., 2010. In vitro induction of polyploidy in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 26(3): 283-295.
- Breuer, C., Stacey, N.J., West, C.E., Zhao, Y., Chory, J., Tsukaya, H., Azumi, Y., Maxwell, A., Roberts, K. and Sugimoto-Shirasu, K., 2007. BIN4, a novel component of the plant DNA topoisomerase VI complex, is required for endoreduplication in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 19(11): 3655-3668.
- Burits, M. and Bucar, F., 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. Phytotherapy Research, 14(5): 323-328.
- Chakraborti, S.P., Vijayan, K., Roy, B. and Qadri, S., 1998. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). Plant Cell Reports, 17: 799-803.
- Chen, L.L. and Gao, Sh.L., 2007. In vitro Tetraploid induction and generation of tetraploids from

mixoploid in *Astragalus memberanceus*. Science of Horticulture, 112: 339-344.
- Cramer, C.S., 1999. Laboratory techniques for determining ploidy in plants. Horticulture Technology, 9(4): 594-596.
- Datta, A. and Saha, A., 2003. Cytomorphological studies and seed protein characterization of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascene* L. Cytologia, 68: 51-60.
- Dhawan, O.P. and Lavania, U.C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: A review. Euphytica, 87: 81-89.
- Dhooghe, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D. and Van Labeke, M.C., 2009. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. Euphytica, 168: 33-40.
- Fang, Z.J., Hua, L.Q., Ling, W.K., Chao, L.Q. and Yang, S., 2009. Tetraploid induction of *Lilium tsingtauense* by colchicine. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 23(3): 454-457.
- Hajhashemi, V., Ghannadi, A. and Jafarabadi, H., 2004. Black cumin seed essential oil, as a potent analgesic and antiinflammatory drug. Phytotherapy Research, 18: 195-199.
- Hodgson, J.G., Sharafi, M., Jalili, A., Diaz, S., Montserrat-Marti, G. and Palmer, C., 2010. Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog? Annual Botany, 105: 573-584.
- Kermani, M.J., Sarasan, V., Roberts, A.V., Yokoya, A., Wentworth, J. and Sieber, V.K., 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effects on plant morphology and pollen viability. Theoretical Applied Genetics, 107: 1195-1120.
- Lavania, U.C., 2005. Genomic and ploidy manipulation for enhanced production of phyto-pharmaceuticals. Plant Genetic Resources, 3: 170-177.
- Maamoun, M.K.M., EI-Mahrouk, M.E., Dewir, Y.H. and Omran, S.A., 2014. Effect of radiation and chemical mutagens on seeds germination of black cumin (*Nigella sativa* L.). Journal of Agricultural Technology, 10(5): 1183-1199.
- Ochatt, S.J., Patat-Ochatt, E.M. and Moessner, A., 2011. Ploidy level determination within the context of in vitro breeding. Plant cell Tissue Organ Culture, 104: 329-341.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M.E. and Sedghi Moghadam, M., 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production, 4(2): 87-98.
- Pande, S. and Khetmalas, M., 2012. Biological effect of sodium azide and colchicine on seed germination and callus induction in *Stevia Rebaudiana*. Asian Journal of Experimental Biological Science, 3: 93-98.
- Roychowdhury, R. and Tah, J., 2011. Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in M1 Dianthus generation. Current Botany, 2: 19-23.
- Salehi Surmaghi, M.H., 2008. Herbal Medicine and Herbal Therapy (Vol. 2). Donyay Taghziah Press. Tehran Iran, 380p.
- Sarathum, S., Hegele, M., Tantiviwat, S. and Nanakorn, M., 2010. Effect of concentration and duration of colchicine treatment on polyploidy induction in *Dendrobium scabrilingue* L. European Journal of Science Horticulture, 75(3): 123-127.
- Sari, N., Abak, K. and Pitrat, M., 1999. Comparison of ploidy level screening methods in Watermelon. Science Horticulture, 82: 265-277.
- Shao, J., Chen, C. and Deng, X., 2003. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 75: 241-246.
- Shiga, I., Uno, Y. Kanechi, M. and Inagaki, N., 2009. Identification of polyploidy of in vitro anther-derived shoots of *Asparagus officinalis* L. by flowcytometric analysis and measurement of stomatal length. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 78: 103-108.
- Soltis, P.S. and Soltis, D.E., 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. Proceedings of the National Academy of Sciences, 97: 7051-7057.
- Swamy, S.M. and Tan, B.K., 2000. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* seeds. Journal of Ethnopharmacology, 70: 1-7.
- Sybenga, J., 1992. Cytogenetics in Plant Breeding. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 469p.
- Urwin, N.A.R., Horsnell, J. and Moon, T., 2007. Generation and characterizationof colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. Euphytica, 156: 257-266.
- Wan, Y., Duncan, D.R., Rayburn, A.L., Petolino, J.F. and Widholm, J.M., 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther derived maize callus. Theoretical and Applied Genetics, 81: 205-211.

Polyploidy induction in black cumin (*Nigella sativa* L.) by colchicine treatment on seeds

S. Zishan[1], R. Asghari Zakaria[2*] and N. Zare[3]

1- M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2*- Corresponding author, Department of Agronomy and plant breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, E-mail: r-asghari@uma.ac.ir
3- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: July 2015 Revised: October 2015 Accepted: January 2016

Abstract

Nigella Sativa L. is an annual plant from Ranunculacea family. Its seeds contain protein, alkaloids, kinons, saponin, and volatile essential oil used as antibacterial agent and treatment of some diseases. This study was aimed to investigate the polyploidy induction in *Nigella sativa* via seed treatment at colchicine concentrations of 0, 0.025%, 0.05%, 0.1%, and 0.2% for 8, 24 and 48 hours. The study was conducted in a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. The percentage of tetraploid plants was determined through the morphological and chromosomal studies. Results of analysis of variance showed that effects of colchicine level, treatment duration, and the interaction between them were significant on the survival of plants and percentage of tetraploidy induction. The seed germination and viability of plants significantly decreased with increasing of colchicine concentration and treatment duration. The lowest number of survived plants was observed at a concentration of 2.0% colchicine and a treatment time of 24 and 48 hours. The highest percentage of induced tetraploid plants (9.9%) was obtained at a concentration of 0.05% colchicine with a treatment time of 48 hours, showing no significant difference with concentrations of 1 and 2 % at the same treatment time. The plants treated with colchicine showed higher plant height, internodes length, capsule width and length compared to that of control plants. Furthermore, they had larger stomata with lower number as compared with diploid plants.

Keywords: Autopolyploidy, colchicine, *Nigella sativa* L., polyploidy induction.