"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد هفتم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۷
(ص ۲۵۸-۲۴۷)

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 7, No.: 2, Autumn and Winter 2018
(pp: 247-258)
DOI: 10.22034/ijsst.2019.110200.1078

بررسی و مطالعه نگهداری بذر گیاه دارویی سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) به روش فراسرد با استفاده از تیمارهای محافظتی

مهدی کاکایی[1*]، محسن منصوری[2]

۱- استادیار دانشگاه پیام‌نور، بخش کشاورزی (اصلاح‌نباتات و ژنتیک)، تهران، ایران
۲- گروه طب ایرانی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، تهران– ایران.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۹)

چکیده

با توجه به اهمیت ژرم‌پلاسم گیاهان دارویی از جمله سیاه‌دانه، انجام مطالعاتی در خصوص حفاظت این منابع ژنتیکی ارزشمند، ضروری است. روش نوین حفاظت انجمادی که در واقع نگهداری نمونه‌های زیستی در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه‌سلسیوس است، دارای اهمیت زیادی می‌باشد. در پژوهش حاضر حفاظت انجمادی بذور گیاه سیاه‌دانه به روش شیشه‌ای شدن مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در سه تکرار با دو فاکتور، فاکتور اول در دو سطح محلول آب‌گیری (PVS2 و PVS3) و فاکتور دوم زمان‌های آبگیری از بذور قبل از فرآیند انجماد طی هفت سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) به صورت فاکتوریل و با آرایش طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام پذیرفت. نتایج نشان داد که زمان تیمار برای صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. همچنین، تجزیه واریانس بذور تیمار شده بر اساس نوع محلول برای کلیه صفات مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد. اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک درصد و برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. به‌طورکلی نتایج تجزیه واریانس حاکی از این بود که نوع محلول و زمان آبگیری در فرآیند شیشه‌ای شدن و حفاظت انجمادی گیاه سیاه‌دانه در شاخص‌های مورد ارزیابی مؤثر است. همچنین، تیمار بذور با استفاده از محلول PVS3 و طی بازه‌های زمانی ۲۰ و ۴۰ دقیقه، دارای بیشترین مقدار طول ریشه‌چه (۳/۰۷)، طول ساقه‌چه (۰/۹۲) و درصد جوانه‌زنی (۰/۸۸۸۱) بود. نتایج این مطالعه می‌تواند در حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاه دارویی و با اهمیت سیاه‌دانه مورد استفاده باشد.

واژگان کلیدی: سیاه‌دانه، حفاظت انجمادی، محلول حفاظت‌کننده، شیشه‌ای شدن.

The investigation and study of Black Cumin seeds (*Nigella sativa*) preservation by frost method using protective treatments

M. Kakaei[1*], M. Mansouri[2]

1- Assistant Professor, Department of Agriculture (Plant Breeding and Genetics), Faculty of Sciences, Payame Noor University, Tehran, Iran.
2- Department of Persian medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran–Iran.
(Received: Apr. 12, 2017– Accepted: Sept. 10, 2017)

Abstract

Due to the importance of medicinal herbs germplasm such as black seed, studies for protection of this valuable genetic resource is essential. A new method of freeze protection is actually keeping biological samples in liquid nitrogen at minus -196 degrees Celsius, is very important. In this study, Cryopreservation of *Nigella sativa* seeds was studied by method vitrification. This experiment in three replications with two factors, factor 1 with soluble dewatering (PVS2 and PVS3) and factor 2 with dewatering times of seeds before freezing process during the 7 period (20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140 minutes) with factorial arrangement in a completely randomized design (CRD) was analyzed. Results showed that treatment time for root length, shoot length and percentage of germination (percent survival) was significant at the level of 1%. Also, analysis of variance of treated seeds based on the type of solution for all studied traits showed a significant difference at 1% probability level. The interaction between the treatment solution for the root length and shoot length at 1 percent level and for germination percentage was significant at the 5% level. Overall, analysis of variance indicate the type of solution and dewatering time in the process of vitrification and freeze protection *Nigella sativa* is effective in assessment indicators. Also, seed treatment with solution PVS3 and during intervals 20 and 40 minutes, was the highest amount of root length (3.07), shoot length (0.92) and germination (0.8881). The results of this study can be used in protecting of medicinal and important plant Black Cumin seeds germplasm.

Keywords: *Nigella sativa*, Cryopreservation, Canservesolution, Vitrification.

* Email: m_kakaei@pnu.ac.ir

مقدمه

امروزه به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی، روز به روز به گیاهان دارویی و فرآورده‌های حاصل از آن بیشتر توجه می‌گردد و اعتقاد عموم در خصوص استفاده از آن‌ها پیوسته تقویت می‌گردد (BahramiNejad and Papzan, 2005).

آمار جهانی نشان می‌دهد که مواد مؤثره حدود پنجاه درصد از داروهای عرضه شده به بازار دارای منشأ طبیعی است و حتی در برخی از کشورها این آمار به ۹۰ درصد نیز می‌رسد (Omid bigi, 2000). از جمله این گیاهان دارویی، گیاه سیاه‌دانه است که بقراط در آثار خود مصرف دانه آن را برای مداوای بسیاری از بیماری‌ها توصیه نموده است (Balouchi*et al*., 2012). علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی روغن دانه‌های سیاه‌دانه از این گیاه در درمان سرطان، فشارخون و بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده می‌شود (Khoramdel *et al*., 2010). همچنین، سیاه‌دانه دارای ۴۰-۳۰ درصد روغن، ۱/۵-۰/۵ درصد اسانس، قندهای مختلف، مواد صمغی، آلبومینوییدی[1]، پروتئین (۲۰/۸۵ درصد)، اسیدهای چرب، اسیدآمینه و آلکالوییدها می‌باشد (Faravani and Farsi, 1999).

گیاه سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* L. و نام انگلیسی Black Caraway، Black Cumin، Seed Onion یا Kalunji (Ghosheh *et al*., 1998) بومی غرب آسیا،گیاهی یکساله، با ارتفاع حدود ۶۰ سانتی‌متر، میوه کپسول پنج قسمتی، دانه‌های کوچک و به رنگ سیاه که دارای دوره زندگی کوتاه و مخصوص نواحی نیمه‌خشک می‌باشد (D'Antuono *et al*., 2002; Safarnejad *et al*., 2007). این گیاه از خانواده رانونکولاسه‌آ[2] است با گل‌های سفید یا آبی کم‌رنگ تا آبی پر رنگ دارای دانه‌های سفید شیری رنگ که در تماس با هوا سیاه رنگ می‌شوند (Falahhosseini *et al*., 2010; Goreja, 2003). این گیاه هم به صورت وحشی می‌روید و هم به صورت زراعی کشت می‌گردد. در ایران این گیاه در استان اراک و در قسمت‌هایی از کرمانشاه به صورت خودرو می‌روید و در نواحی مختلفی از ایران از جمله اصفهان کشت می‌شود (BahramiNejad and Papzan, 2005). سیاه‌دانه یک گیاه علفی بومی است که به عنوان ادویه غذایی و نیز برای اهداف درمانی و به عنوان درمانی طبیعی برای تعدادی از عوارض و بیماری‌ها استفاده شده است (Ali and Blunden, 2003). دانه این گیاه دارای یک ساپونوئید به نام ملانتین و همچنین دارای لیپیدهای غیرفرار، پروتئین‌ها و لیپیدهای ضروری می‌باشد (Nafez *et al*., 2009). نشان داده شده است که روغن غیرفرار سیاه‌دانه و تیموکینون اثر آنتی‌اکسیدانی دارد (Abdel-Salam *et al*., 1998).

ژرم‌پلاسم از مهم‌ترین منابع هر کشور به شمار می‌رود که از اهمیت خاصی برخوردار است و باید نسبت به حفظ و نگهداری آن اقدام نمود.

حفاظت انجمادی روشی برای ذخیره‌سازی نمونه‌های زیستی در ازت مایع با دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس است که از اصلی‌ترین و موفق‌ترین روش‌های نگهداری درازمدت ژرم‌پلاسم به شمار می‌رود (Popov *et al*., 2006; Benson, 2008). در دمای مذکور همه تقسیمات سلولی و فرآیندهای متابولیکی در مواد گیاهی متوقف شده و در نتیجه نگهداری آن‌ها در طولانی‌مدت فراهم می‌گردد (Suzuki *et al*., 2005).

یکی از روش‌های مؤثر در افزایش کارایی نگهداری و زنده‌مانی نمونه‌های گیاهی در شرایط انجماد، روش شیشه‌ای شدن[3] با استفاده از محلول‌های مربوطه گیاهی است. در حقیقت، شیشه‌ای کردن فرآیندی است که آب از حالت مایع وارد یک فاز شیشه‌ای بی‌شکل می‌شود که فاقد ساختار کریستالی است. در این حالت نگهداری بافت‌های گیاهی در ازت مایع بدون تشکیل کریستال‌های یخ امکان‌پذیر خواهد بود (Gale *et al*., 2008).

اخیراً با توجه به این‌که در روش‌های اصلاحی، ارقام

---

[1]-Albomenoeidi
[2]- Ranunculaceae
[3]- Cryopreservation

DOI: 10.22034/ijsst.2019.110200.1078

بومی با ارقام اصلاح شده جایگزین شده یا در آینده جایگزین خواهند شد، ارقام بومی گیاهان به ویژه گیاهان دارویی که دارای منابع ژنتیکی ارزشمندی هستند، در معرض خطر هستند. از این رو، برای حفظ ژرم‌پلاسم با ارزش گیاهان، از روش‌هایی نوین از جمله روش حفاظت انجمادی استفاده می‌گردد (Arzani, 2004). حفاظت ژرم‌پلاسم بذور بسیاری از گونه‌های گیاهی به روش انجماد انجام شده و در برخی موارد جوانه‌زنی غیرعادی و یا مرگ به علت آسیب‌های درونی گزارش شده است. اغلب این مشکلات، به دلیل خصوصیات بذر مانند اندازه، رطوبت و ترکیبات شیمیایی بوده است (Belletti *et al*., 1990).

منصوری و همکاران (Mansouri *et al*., 2013)، در مطالعه‌ای با عنوان مطالعه حفاظت انجمادی بذور کلزا به روش شیشه‌ای شدن، اثر متقابل زمان تیمار با نوع محلول حفاظت‌کننده در سطح احتمال پنج درصد را مورد بررسی قرار دادند. غفارزاده نمازی و همکاران (Ghaffarzadeh-Namazi *et al*., 2015)، در مطالعه حفاظت انجمادی بذور گیاه دارویی *Satureja bachtiarica*، حفاظت انجمادی را روشی مطلوب جهت حفظ ژرم‌پلاسم این گیاه دارویی پیشنهاد کردند. در اثر کاهش دما، مقداری از آب موجود در سلول‌ها از طریق دهیدراسیون (آبگیری) اسمزی خارج می‌شود و در صورتی می‌توان انواع سلول‌ها را به شکل موفقیت‌آمیز منجمد نمود که کریستاله شدن آب باقیمانده در سلول صدمات جبران‌ناپذیری را به سلول وارد نسازد (Keivanloo and Sudagar., 2012). مواد ضد انجماد باعث کاهش تشکیل کریستال‌های یخی درون سلول شده و از این طریق صدمات سلولی را به حداقل می‌رسانند، با این وجود اکثر این مواد بدلیل سمیت شدید و ایجاد صدمات اسمزی می‌توانند سبب بروز صدمات و آسیب‌های سلولی شوند (Pillai *et al*., 2001).

با توجه به اهمیت مواد مؤثره موجود در بذر گیاه سیاه‌دانه، در تحقیق حاضر به منظور یافتن روش مناسب برای حفاظت از ژرم‌پلاسم، بذور گیاه سیاه‌دانه تحت تیمار با محلول‌های مورد استفاده در حفاظت انجمادی قرار گرفتند.

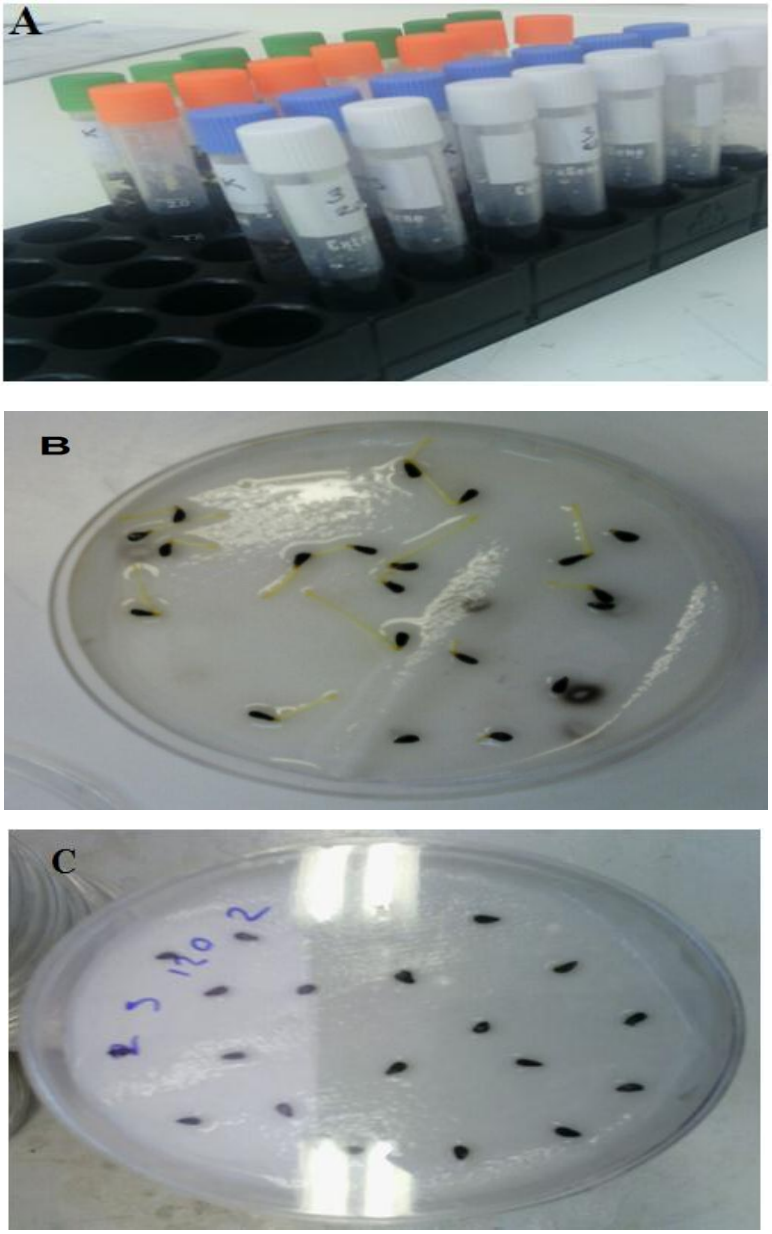
مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر از بذر گیاه سیاه‌دانه به منظور یافتن روش مناسب حفاظت انجمادی ژرم‌پلاسم این گیاه در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد، استفاده شد.

ابتدا بذور سیاه‌دانه با کمک هیپوکلریت سدیم ۳ درصد برای مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس با آب مقطر شستشو و با الکل ۷۰ درصد به مدت ۵۰ ثانیه مجدداً استریل شدند و در نهایت با آب مقطر شستشو صورت پذیرفت. پس از خشک‌شدن تعداد ۲۰ بذر در دمای آزمایشگاه به لوله‌های کوچک انجمادی ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند و با استفاده از محلول‌های حفاظت‌کننده تیمار شدند. محلول‌های استفاده شده دو محلول پرکاربرد در حفاظت انجمادی بافت گیاهی به اسامی PVS2 (شامل ۳۰٪ گلیسرول، ۱۵٪ اتیلن گلایکول، ۱۵٪ دی‌متیل سولفوکساید با زمینه محیط کشت مایع MS) و PVS3 (شامل ۴۰٪ گلیسرول و ۴۰٪ ساکارز (WV) بودند (Volk *et al*., 2006). این محلول‌ها با کمک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل گشته و در زیر هود لامینار با کمک محلول‌های مذکور، تیمار بذور صورت پذیرفت. تیمار بذور در دمای آزمایشگاه و در ۷ سطح زمانی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ دقیقه) به منظور آبگیری صورت گرفت.

پس از اتمام زمان‌های یاد شده، محلول‌های قبلی از لوله‌های کوچک درب‌دار شیشه‌ای مربوط خارج گردید و محلول تازه به مقدار ۰/۵میلی‌لیتر در لوله‌های مذکور قرار گرفت. سپس به مدت ۵۰ ساعت در نیتروژن مایع قرار داده شدند (Pennycooke and Towill, 2000). لوله‌های کوچک درب‌دار شیشه‌ای بعد از طی مدت زمان مربوطه در حمام آب گرم با دمای حدود ۵۰

درجه‌سلسیوس و پس از ۱۵ دقیقه در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. در مرحله بعدی محلول‌های حفاظت‌کننده از لوله‌های مذکور خارج گردیده و جهت تمیز کردن محلول‌های حفاظت‌کننده از نمونه‌های بذری، نمونه‌ها با یک محلول غلیظ (ساکارز ۰/۵ مولار) شستشو شدند. سپس، بذرها با آب مقطر استریل چند بار شستشو و در نهایت در پتری‌دیش‌های ۱۰ سانتی‌متری روی کاغذ صافی کشت و با آب مقطر تغذیه شدند (شکل B ۱). جوانه‌زنی بذور در سطوح زمانی مذکور یادداشت‌برداری گردید و صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.



شکل ۱– A): تیمار نمونه‌های بذر سیاه‌دانه با محلول‌های مختلف حفاظت‌کننده قبل از عمل حفاظت انجمادی، B): نمونه‌های بذر سیاه‌دانه کشت شده و جوانه‌زده در درون پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی بعد از عمل حفاظت انجمادی، C): نمونه شاهد بدون استفاده از محلول‌های تیمارکننده (ابتدای کشت).

Figure 1- Treatment of rapeseed seeds with different protective solutions before cryopreservation (A), Black cumin seed samples cultured and germinated in Petri dishes containing the filter paper after cryopreservation (B), C): Control sample without using the treatment solution (Early planting).

DOI: 10.22034/ijsst.2019.110200.1078

در کلیه آزمون‌های این تحقیق تیمار شاهد بدون استفاده از محلول‌های PVS2 و PVS3 مورد استفاده قرار گرفته است. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (در هر پتری‌دیش ۲۰ عدد بذر قرار گرفت). عملیات آماری برای سه صفت طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی با کمک نرم‌افزار SAS 9.1 صورت پذیرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell 2016 ترسیم گردید.

نتایج

اثر دمای فراسرد (نیتروژن مایع) روی جوانه‌زنی بذور گیاه دارویی سیاه‌دانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که زمان تیمار برای صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه درسطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار و برای صفت درصد جوانه‌زنی غیرمعنی‌دار بود (جدول ۱). در خصوص نوع محلول برای کلیه صفات (درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه) در سطح احتمال یک‌درصد تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید (جدول ۱). اثر متقابل زمان تیمار در نوع محلول برای صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در سطح احتمال یک‌درصد و برای صفت درصد جوانه‌زنی در سطح احتمال پنج‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول (۲) مقایسه میانگین اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور با محلول محافظت‌کننده روی درصدجوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذر سیاه‌دانه را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است در زمان ۴۰ دقیقه بیشترین رشد مربوط به صفت طول ساقه‌چه بوده است. همچنین، صفت طول ریشه‌چه متناسب با صفت طول ساقه‌چه، دارای بیشترین میزان در بازه‌های زمانی مذکور هستند که در یک گروه آماری بر اساس روش مقایسه میانگین دانکن قرار دارند. جدول (۳) میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفات طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی بذور گیاه سیاه‌دانه و همچنین شرایط تیمار شاهد را نشان می‌دهد. همان طور که مشاهده می‌شود، بیشترین مقدار صفات طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذوری دیده می‌شود که با محلول PVS3 تیمار شده‌اند و لیکن بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد می‌باشد که مورد انتظار نیز می‌باشد. جداول (۴) و (۵) به ترتیب مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذر سیاه‌دانه را نشان می‌دهد.

بر اساس جدول (۴)، نیز بذور تیمار شده با محلول PVS2 در زمان ۴۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۱/۰۲) و طی زمان ۱۰۰ دقیقه (۰/۳۱)،۱۲۰ دقیقه (۰/۵) و ۱۴۰ دقیقه (۰/۵۳) دارای کمترین مقدار بود. بذور تیمار شده با محلول PVS3 نیز به ترتیب در زمان ۲۰، ۱۲۰،۴۰ در یک گروه و با تیمارهای زمانی دیگر یعنی زمان ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۴۰ دقیقه در گروه جداگانه دیگر قرار گرفتند. در تیمار شاهد نیز زمان ۱۲۰ دقیقه (۱/۲۷) دارای بیشترین مقدار و زمان ۱۰۰ دقیقه (۰/۵۲) دارای کمترین مقدار اختصاص داده شده بودند. بر اساس جدول (۵)، بذور تیمار شده با محلول PVS2 در زمان ۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۲/۹۹) و با زمان‌های ۴۰ دقیقه (۲/۷) و ۶۰ دقیقه (۲/۲۹) در یک گروه قرار دارند و زمان ۱۲۰ دقیقه (۱/۵) دارای کمترین مقدار در صفت طول ریشه‌چه بود و نیز با زمان‌های ۶۰ دقیقه (۲/۲۹) و ۱۴۰ دقیقه (۲/۱۳) در یک گروه قرار گرفتند. همچنین بذور تیمار شده با محلول PVS3 در زمان ۱۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۳/۹۸) و با زمان ۴۰ دقیقه (۳/۸۱) در یک گروه دسته‌بندی شدند و در زمان ۱۴۰ دقیقه دارای کمترین مقدار (۲/۳۱) بودند که با زمان‌های ۶۰ دقیقه (۲/۹۱)، ۸۰ دقیقه (۲/۶۵) و ۱۰۰ دقیقه (۲/۶۱) در یک گروه دسته‌بندی شدند.

جدول ۶، مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت جوانه‌زنی در بذر سیاه‌دانه را نشان می‌دهد. بر اساس داده‌های این جدول، بذور تیمار شده با محلول PVS2 در زمان ۲۰ دقیقه دارای بیشترین مقدار (۰/۸۶۶۵) بود و زمان‌های ۴۰،

۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه در یک گروه قرار دارند. زمان ۱۲۰ دقیقه (۰/۷) نیز دارای کمترین مقدار در صفت درصد جوانه‌زنی بود که با زمان‌های ۱۲۰ (۰/۷) و ۱۴۰ (۰/۷۳۳) دقیقه در یک گروه قرار گرفتند. در خصوص محلول PVS3 نیز زمان‌های ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه در یک گروه قرار گرفتند و سایر زمان‌ها (۶۰ و ۱۴۰ دقیقه) نیز در گروه دیگر آماری جای داشتند. تیمار شاهد نیز زمان‌های ۲۰ و ۱۲۰ دقیقه را در یک گروه آماری، زمان‌های ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ دقیقه را در گروه آماری دیگر و نیز سایر زمان‌ها را در گروهی مجزا طبقه‌بندی نمود.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان اعمال تیمار و نوع محلول محافظت‌کننده روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه در بذور گیاه سیاه‌دانه.

Table 1- Variation analysis for the effect of time of treatment and protective solution on germination percentage, root length and shoot length of black cumin seeds.

منابع تغییرات Source of variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares		
		درصد جوانه‌زنی Germination percentage	طول ریشه‌چه Root length	طول ساقه‌چه Shoot length
زمان تیمار Time of treatment (A)	6	5.84**	35.66**	5.05**
نوع محلول Kind of solution (B)	2	40.57**	78.43**	10.74**
زمان تیمار × نوع محلول Time of treatment × Kind of solution (A×B)	12	3.14*	11.24**	1.009**
اشتباه Error	42	0.792	0.39	0.08
ضریب تغییرات ٪ Coefficient of variation		5.14	23.04	36.14

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۵٪، ۱٪ و ns: غیرمعنی‌دار

* and **: Significant at level of 5% and 1%, ns: none significant

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان تیمار بذور سیاه‌دانه با محلول محافظت‌کننده روی درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بذور سیاه‌دانه.

Table 2- Mean comparison for interaction time of treatment seed treatment with protective solutions on germination, root and shoot length black cumin seeds

زمان اعمال تیمار (بر حسب دقیقه) Time of treatment (min.)	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Root length	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) Stem length
20	0.8833 ± 0.02 a	3.20 ± 0.12 a	0.93 ± 0.04b
40	0.8667 ± 0.03 a	3.26 ± 0.13 a	1.04 ± 0.04 a
60	0.8000 ± 0.03 ab	2.65 ± 0.11 b	0.76 ± 0.03 c
80	0.8500 ± 0.03 ab	2.52 ± 0.13 b	0.71 ± 0.03 cd
100	0.8500 ± 0.03 ab	1.96 ± 0.14 d	0.54 ± 0.04e
120	0.8500 ± 0.03 ab	3.14 ± 0.18a	0.98 ± 0.06b
140	0.7583 ± 0.4 b	2.29 ± 0.13c	0.68 ± 0.05 d

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات نوع محلول محافظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و درصد جوانه‌زنی گیاه سیاه‌دانه.

Table 3- Mean comparison for protective effects of kind of protective solution length of root, shoot and germination of black cumin seeds.

صفت Trait	نوع محلول Kind of Solution		
	PVS2	PVS3	شاهد Control
طول ریشه‌چه Root length	2.172 ± 0.07 c	3.07 ± 0.06 a	2.92 ± 0.02 b
طول ساقه‌چه Stem length	0.60 ± 0.02 b	0.92 ± 0.03 a	0.914 ± 0.04 a
درصد جوانه‌زنی Germination percentage	0.7857 ± 0.02 c	0.8881 ± 0.01 b	0.9225 ± 0.01 a

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ساقه‌چه در بذر سیاه‌دانه.

Table 4- Compare the average effects of combination treatment time and the type of protective solution on length of shoot in black cumin seeds

نوع محلول Kind of Solution	زمان اعمال تیمار (بر حسب دقیقه) Time of treatment (min.)						
	20	40	60	80	100	120	140
PVS2	0.63 b	1.02 a	0.7 b	0.54 c	0.31 cd	0.5 c	0.53 c
PVS3	1.07 ab	1.06 ab	0.8 b	0.77 bc	0.76 bc	1.18 a	0.76 bc
شاهد Control	1.12 ab	1.09 ab	0.79 bc	0.82 b	0.52 c	1.27 a	0.75 bc

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ریشه‌چه در بذر سیاه‌دانه.

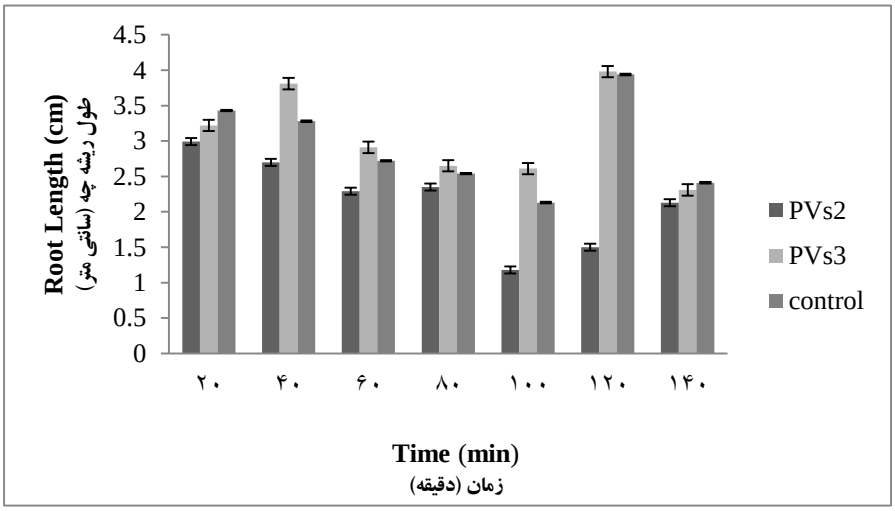
Table 5- Compare the average effects of combination treatment time and the type of protective solution, the length of root in black cumin seeds.

نوع محلول Kind of Solution	زمان اعمال تیمار (بر حسب دقیقه) Time of treatment (min.)						
	20	40	60	80	100	120	140
PVS2	2.94 a	2.7 ab	2.34 bc	2.37 b	1.16 d	1.5 c	2.16 bc
PVS3	3.22 b	3.81 ab	2.91 bc	2.65 c	2.61 c	3.98 a	2.31 d
شاهد Control	3.43 b	3.28 ab	2.72 b	2.54 bc	2.13 c	3.94 a	2.41 bc

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل دوگانه زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت درصد جوانه‌زنی در بذر سیاه‌دانه.

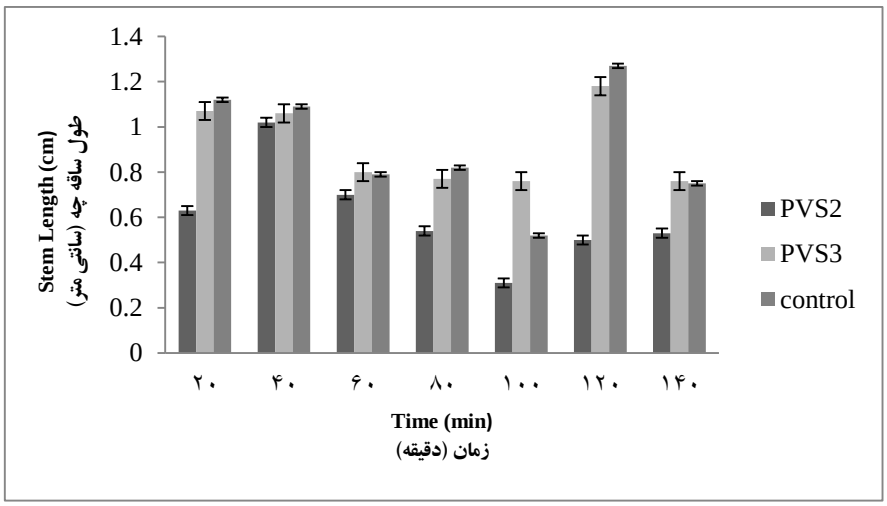
Table 6- Compare the average effects of combination treatment time and the type of protective solution, the germination percent in black cumin seeds.

نوع محلول Kind of Solution	زمان اعمال تیمار (بر حسب دقیقه) Time of treatment (min.)						
	20	40	60	80	100	120	140
PVS2	0.8665 a	0.8 b	0.8 b	0.8 b	0.8 b	0.7 c	0.733 c
PVS3	0.9 b	0.933 ab	0.8 c	0.9 b	0.9 b	1 a	0.783 c
شاهد Control	0.9665 a	0.933 b	0.85 c	0.9165 bc	0.933 b	0.9665 a	0.875 c



شکل ۲- نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور سیاه‌دانه با دو نوع محلول محافظت‌کننده برروی صفت طول ساقه‌چه.

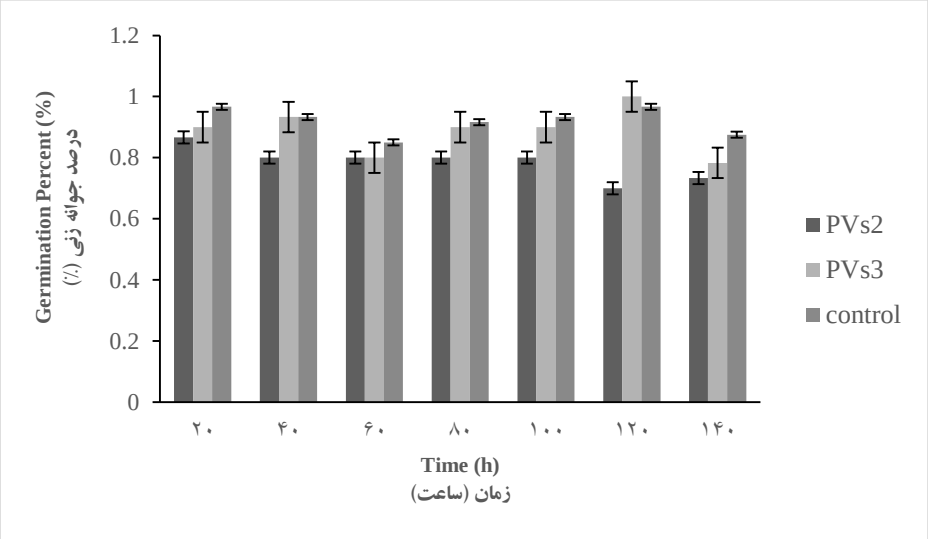
Figure 2- Black cumin seeds treated with two types of charts comparing the effects of time on the protective solution shoot length.



شکل ۳- نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور سیاه‌دانه با دو نوع محلول محافظت‌کننده برروی صفت طول ریشه‌چه.

Figure 3- Black cumin seeds treated with two types of charts comparing the effects of time on the protective solution root length.

DOI: 10.22034/ijsst.2019.110200.1078



شکل ۴- نمودار مقایسه اثر زمان‌های مختلف تیمار بذور سیاه‌دانه با دو نوع محلول محافظت‌کننده برروی صفت درصد جوانه‌زنی.

Figure 4- Black cumin seeds treated with two types of charts comparing the effects of time on the protective solution germination percent.

بحث

نتایج نشان داد که بذور این گیاه دارویی بااهمیت، با استفاده از روش شیشه‌ای شدن و در مدت زمان‌های بیان شده مورد بررسی، قابلیت زنده‌مانی و جوانه‌زنی را دارا می‌باشند. معنی‌دار بودن زمان تیمار برای کلیه صفات (درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه) در سطح احتمال ۱٪ یعنی اینکه هر صفت در مواجه با هر زمان تیماری تنوع و اختلاف از خود بروز می دهد یعنی زمان های مختلف اثرات مختلفی هم روی صفت (صفات) داشته است به عبارتی با تغییر زمان تیمار، صفات هم تغییرات معنی‌دار از خود بروز می‌دهند. تغییر در نوع محلول نیز تغییرات معنی‌دار در کلیه صفات نشان می‌دهد که نشان از قابلیت ایجاد تنوع توسط نوع محلول، روی صفات مورد مطالعه می‌باشد. اثر متقابل زمان تیمار و نوع محلول نیز باعث ایجاد تنوع در کلیه صفات مورد مطالعه می‌باشد که نشان‌دهنده بروز تنوع در صفات بر اساس این اثر متقابل می‌باشد. بطورکلی می‌توان بر اساس این تنوع صفات بیشتر و تیمارهای بیشتری مورد مطالعه قرار داد و نهایتاً به نتیجه‌گیری در خصوص تیمار برتر دست یافت که نتایج این آزمایش نشان از تنوع مطلوب می‌باشد. یعنی اینکه محلول‌های مورد استفاده و زمان‌های مورد استفاده یکسان عمل نکرده‌اند بلکه از خود اختلاف نشان داده‌اند که قابلیت انتخاب تیمار برتر را ایجاد نموده‌اند.

بذور در حالت شاهد (بدون تیمار با محلول‌های حفاظت‌کننده) دارای جوانه‌زنی بهتر و مطلوب‌تری در قیاس با حالت تیمار بذور با محلول‌های حفاظت‌کننده بودند؛ چراکه حالت تیمار با مواد ضد انجماد بالاخره با درصدی آسیب به بذر همراه خواهد بود. چراکه بذر با یک ماده شیمیایی محافظ تیمار می‌شود این ماده شیمیایی محافظ، ضمن حفاظت از بذر ممکن است خود نیز اثرات اندک منفی روی بذر بگذارد.

بذور سیاه‌دانه پس از تیمار با محلول‌های PVS2 و PVS3 می‌توانند در دمای ۱۹۶- درجه سلسیوس و در بازه‌های زمانی مورد مطالعه با کاهش اندک زنده‌مانی، دوام آورند. بنابراین، می‌توان روش حفاظت انجمادی را یک روش مناسب به منظور حفاظت از ژرم‌پلاسم گیاه مذکور دانست.

در جدول ۳ اگرچه بذور تیمار شده با محلول PVS3

دارای میزان طول ریشه‌چه و طول ساقه‌چه بیشتری نسبت به تیمار شاهد هستند، ولیکن دارای میزان درصد جوانه‌زنی کمتری نسبت به شاهد می‌باشد. در واقع، اثر آسیب‌رسان در بذور تیمار شده با محلول‌های حفاظت شده در قیاس با نمونه شاهد ولو اندک مشخص و پیدا می‌باشد.

هوو و همکاران (Hu *et al*., 2013)، نشان دادند که بذور *B. formosana seeds* می‌توانند برای مدت طولانی با استفاده از روش حفاظت انجمادی و شیشه‌ای شدن نگهداری شوند. زمانی که بذور *B. formosana seeds* با نیتروژن مایع و محلول PVS2 تیمار شدند، درصد جوانه‌زنی در بازه زمانی ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه، افزایش یافت. افزایش درصد جوانه‌زنی می‌تواند ناشی از تغییر در دما (Almeida *et al*., 2002; Rocha *et al*., 2009) و شکستن یا تشکیل یک شبکه شکاف در ساختارهای احاطه شده جنین باشد (Salomão, 2002) که ممکن است باعث شکستن خواب فیزیکی در بذر شده باشند که در واقع در این بازه از زمان این تأثیر بیشتر بوده است. همچنین، در پژوهشی که روی محورهای جنینی گیاه *Lilium* در شرایط انجماد انجام گرفت (Kaviani *et al*., 2010)، درصد جوانه‌زنی افزایش یافت. در مطالعه‌ای دیگر روی ذرت نیز، پس از نگهداری بذور ذرت طی مدت سه روز در ازت مایع، درصد جوانه‌زنی بین ۸۰ تا ۸۵ درصد بود (Wen *et al*., 2010).

گزارش شده است که به طور معمول، مدت زمان انجماد تأثیری بر حفاظت انجمادی از راه شیشه‌ای کردن ندارد (Rong & Hua, 2009). به نظر می‌رسد در صورتی که نمونه بتواند در ازت مایع زنده بماند، تفاوت محسوسی در مدت زمان‌های مختلف نگهداری در ازت مایع وجود ندارد؛ زیرا با کاهش شدید فعالیت‌های متابولیکی، مسئله مدت زمان نگهداری تقریباً منتفی می‌گردد (Shatnawi, 2011). در این دمای بسیار کم، همه تقسیم‌های سلولی و فرآیندهای متابولیکی و فیزیولوژیکی ریزنمونه‌های گیاهی متوقف می‌گردد (Suzuki *et al*., 2005). بر اساس جدول ۴ تقریباً شاهد آزمایش و محلول PVS3 از وضعیت مطلوب‌تری در بررسی اثر متقابل زمان تیمار و نوع محلول حفاظت‌کننده روی صفت طول ساقه‌چه برخوردار است. احتمالاً عدم استفاده از محلول‌های ضد انجماد PVS2 جهت رشد صفت ساقه‌چه مناسب‌تر هست چرا که در جدول ۶ وضعیت مطلوب جوانه‌زنی، در تیمار شاهد و محلول PVS3 واضح می‌باشد هر چه جوانه‌زنی با وضعیت بهتر و سریع‌تر اتفاق افتد رشد طول ساقه‌چه هم به موازات آن افزایش یافته و مطلوب خواهد بود. در جدول ۵ محلول PVS3 تقریباً از وضعیت مناسب‌تری نسبت به PVS2 و تیمار شاهد برخوردار است. مؤثر بودن محلول PVS3 در رشد صفت طول ریشه‌چه احتمالاً ناشی از ترکیبات تشکیل‌دهنده این محلول می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این آزمایش و آزمایشات مشابه مطالعه حفاظت انجمادی بذور جهت نگهداری و حفاظت از بذور در بانک‌های ژن گیاهی بسیار مفید و ضروری به‌نظر می‌رسد. لذا در عین حال، تیمار بذور با محلول PVS3 بیشتر توصیه می‌گردد. ذخایر ژنتیکی ارزشمند برای اهداف به‌نژادی و استفاده از ژن‌های مفید آن‌ها در پژوهش‌های پیش‌رو نیازمند حفاظت صحیح و بدون آسیب هستند. وضعیت صفات مورد مطالعه به‌ویژه صفت جوانه‌زنی در همه‌ی تیمارهای فراسرد مورد بررسی امیدبخش بودند. مطالعه و تحقیق در خصوص سایر روش‌های تیماری حفاظت فراسرد ژرم‌پلاسم، جهت سایر گونه‌های سیاه‌دانه در ایران توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از دانشگاه پیام‌نور مرکز اسدآباد و همه‌ی عزیزانی که در مسیر انجام این گزارش، اینجانبان را یاری کردند بویژه جناب آقای دکتر محسن سعیدی دانشیار دانشگاه رازی قدردانی می‌گردد.

References منابع

Abdel-Salam, I.M., A. Raafat, and H. Abdel-Muniem. 1998. Radioprotective effect of *Nigella sativa* oil on the liver of Swiss albino mice. Egypt. J. Biochem. 16: 167–176.

Ali, B.H., and Blunden, G. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella Sativa*. Phototherapy Res. 17(4): 299–305.

Arzani, A. 2004. Breeding Field Crops (Authored by: Sleper & Poehlman). 3th edition. Isfahan University of Technology Publication. (In Persian)

BahramiNajad, S., and A. Papzan. 2006. Effect of row spacing on different characteristics of black cumin (*Nigella sativa* L.) under Kermanshah conditions.Iranian J. Crop Sci. 8(3): 241–249. (In Persian)

Balouchi, H., A. Yadavi, and M. Movahedi Dehnavi. 2012. Effect of Osmotic Stress on Seed Germination Indices of *Nigella sativa* and *Silybumm arianum.* J. Crop Weed Ecophysiol. 5(20): 97–108.

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. Critical Rev. Plant Sci. 27: 141–219.

D'antuono, F.L., A. Moretti, and F.S.A. Lovato. 2002. Seed yield, components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascene.* Ind. Crops Prod. 15: 59–69.

Falahhosseini, H., R. Mohtashemi., Z. Sadeghi., Y. Saeidi, and A. Falahhosseini. 2010. A review on the pharmacological effects of *Nigella sativa.* J. Med. Plants. 10 (2): 1–18.

Faravani, M., and M. Farsi. 1999. Study of agronomic characters and some cytogenetic traits and genetic diversity in *Nigella Sativa* accission. Final report. Jahade Agriculture Research and Education Organization Press. (In Persian)

Ghosheh, A.O., A.A. Houdi, and A.P. Crooks. 1998. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinines and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.).J. Pharmaceutical Biomed. Analysis. 19: 757–762.

Goreja, W.G. 2003. Black Seed: Nature's Miracle Remedy. Amazing Herbs Press, New York.

Gale, S., A. John, K. Harding, and E. Benson. 2008. Developing cryopreservation for *Picea sitchensis* (sitka spruce) somatic embryos: a comparison of vitrification protocols. Cryo Letters. 29: 135–144.

Ghaffarzadeh-Namazi, N., N. Babaeian, A. Ghamari-zare, and G.H. Nematzadeh. 2015. Cryopreservation the seeds of the medicinal plant Satureja bachtiarica Bunge. Int. J. Biosci. 6(2): 24–29.

Kaviani, B., M.N. Padasht Dehkaei, D. Hashemabadai, and A.H. Darabi. 2010. Cryopreservation of *Lilium Ledebourii* (Baker) Bioss. By encapsulation-vitrification and *in vivo* media for planting of germplasm. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 8(5): 556–560.

Keivanloo, S., and M. Sudagar. 2012. Cryoprotectant toxicity in fish embryos. J. Conserv. Utilization Nat. Res. 1(2): 73–84.

Khoram del, S., A. Koochaki, M. Nasirimahalati, and R. Ghorbani. 2010. The effect of biofertilizers on yield and medicinal plants black cumin (*Nigella sativa*). Iranian J. Field Crops Res. 8(5): 758–766.

Mansouri, M., M. Kakaei, M.R. Abdolahi, and S. Sharifi. 2013. Study of Cryopreservation in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seeds by Vitrification Method. Agric. Biotechnol. 12(2): 33–39.

Nafez, A., S.S. AL-Beitawi, E.L. Ghousein, and H.N. Abdullah. 2009. Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity.Livestock Sci. 125: 304–307.

Omid bigi, R. 2000. Approaches production and processing of medicinal plant. Mashhad Publications, Astan Quds Razavi, Mashhad, Iran. (In Persian)

Pennycook, J., and L. Towill. 2000. Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato (ipomoea batatas L. Lam) by vitrification. Plant Cell Rep. 19 (7): 733–737.

Pillai, B.R., K.J. Rao, and J. Mohanty. 2001. Toxicity of selected Cryoprotectants to the first zoeal stages of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) (de Man). As. Fish. sci. 14: 1–8.

Popov, A.S., E.V. Popova, T.V. Nikishina, and O. N. Vysotskaya. 2006. Cryobank of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences.Int. J. Refrigeration. 29: 403–410.

Rong, H.S., and Y.M. Hua. 2009. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of *in vitro* grown shoot tips of rare and endangered plant *Emmenopteryshenryi* Oliv. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.99: 217–226.

Shatnawi, M.A. 2011. Cryopreservation of *Capparisspinosa* shoot tips via vitrification, encapsulation dehydration and encapsulation vitrification**.** World Appl. Sci. J. 15: 318–325.

Suzuki, M., M. Ishikawa, and T. Akihama. 2005. Cryopreservation of encapsulated gentian axillary needed to increase recovery of tips after cryopreservation buds following 2 step pre culture with sucrose and desiccation. Plant Cell. Tissue and Organ Culture.83: 115–121.

Wen, B., R. Wang., H. Cheng, and S. Song. 2010. Cytological and physiological changes in orthodox maize embryos during cryopreservation. Protoplasma. 239: 57–67.