

## اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک برخی از گیاهان دارویی بر رشد ریشه و مریستم انتهایی پیاز خوراکی

### Cytotoxicity and genotoxicity effects of some medicinal plants on root growth and root tip meristem of *Allium cepa*

ساسان محسن زاده<sup>۱\*</sup>، مهسا فرخ منش<sup>۲</sup>

- ۱- دانشیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شیراز، شیراز، (نگارنده مسئول)
- ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه شیراز، شیراز

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۷/۱۹ - شناسانه برنمود رقمی: 10.22092/mpt.2020.343537.1065

#### چکیده

محسن زاده، س.، فرخ منش، م.، اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک برخی از گیاهان دارویی بر رشد ریشه و مریستم انتهایی پیاز خوراکی نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۳- شماره ۱- پایبند ۴ تابستان ۱۳۹۹ صفحه: ۴۰-۶۱

اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره و اسانس گیاهان دارویی توسط آزمایشهای سیتوژنتیک و پارامترهایی نظیر شاخص میتوزی و ناهنجاریهای کروموزومی قابل ارزیابی است. ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره ی آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان بر میزان شاخص میتوزی و ناهنجاریهای کروموزومی سلولهای مریستمی ریشه ی پیاز خوراکی و رشد آن از اهداف این مطالعه بود. بیست گرم از نمونه های آسیاب شده در ارلنهای جداگانه ریخته شد و ۱۰۰ میلیلیتر آب مقطر به هر یک اضافه گردید. ارلنها توسط فویل آلومینیومی پوشیده شده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. سپس عصاره ها صاف و سانتریفیوژ شدند. به منظور تعیین درصد شاخص میتوزی و ناهنجاریهای کروموزومی سلولهای مریستمی ریشه ی پیاز خوراکی، تعداد ۳۰۰۰ سلول برای هر تیمار شمارش گردید و از طریق تقسیم تعداد سلول های در حال تقسیم یا ناهنجاریهای کروموزومی بر تعداد کل سلول ها ضرب در ۱۰۰ محاسبه شد. نتایج نشان دهنده ی کاهش معنی دار وابسته به غلظت عصاره در شاخص میتوزی و رشد ریشه ی پیاز بود. بیشترین و کمترین اثر سیتوتوکسیک به ترتیب مربوط به عصاره های برگ پرسیاوشان و بذر عدس الملک میباشد. عصاره های هر سه گیاه ناهنجاریهای کروموزومی شامل C-میتوز، چسبندگی کروموزومی، جدا شدگی کروموزومی، پل کروموزومی و میکرونوکلئوس و همچنین مرگ سلولی در سلول های مریستمی ریشه پیاز، عصاره بذر عدس الملک بالاترین میزان ژنوتوکسیک را القا نمود. آزمون ریشه ی پیاز خوراکی یک روش کارآمد برای ارزیابی خواص سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره گیاهان دارویی میباشد. مصرف گیاهان مطالعه شده باید با احتیاط و در حد مجاز صورت پذیرد.

واژه های کلیدی: پیاز، ژنوتوکسیک، سیتوتوکسیک، گیاه دارویی، مریستم

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: mohsenz@shirazu.ac.ir

**مقدمه:**

ژنوتوکسی سیتی) قابل ارزیابی می باشد (Saulo, 2009). ثابت شده است که ترکیبات دارای خاصیت سیتوتوکسیک می توانند باعث کاهش شاخص میتوزی شوند. تاثیرات ژنوتوکسیک را نیز می توان در سطح کروموزومی، مانند تغییر در ساختار کروموزوم ها و افزایش ناهنجاری های کروموزومی در کوتاه مدت یا دراز مدت، مشاهده کرد (Gadano et al., 2006; Ishidate et al., 1988). شاخص میتوزی توسط تعداد کل سلول های در حال تقسیم بر کل سلول های مشاهده شده، مشخص می شود که به عنوان یک پارامتر مهم برای ارزیابی خاصیت سیتوتوکسیک عوامل مختلف، استفاده می گردد. میزان خاصیت سیتوتوکسیک یک عامل را می توان توسط افزایش یا کاهش در شاخص میتوزی تعیین کرد. کاهش معنی دار شاخص میتوزی نسبت به کنترل منفی، می تواند نشان دهنده ی اختلال ناشی از تغییرات شیمیایی در چرخه ی سلولی و میتوز، و در نتیجه اختلال در رشد و توسعه ی ارگانسیم های در معرض باشد. از طرف دیگر، افزایش قابل ملاحظه ی شاخص میتوزی نسبت به کنترل منفی، در نتیجه ی افزایش تقسیم سلولی بوده که می تواند بسیار خطرناک باشد و حتی منجر به تشکیل بافت تومور گردد (Leme and Marin-Morales, 2009). بنابراین، محققین زیادی در مطالعات خود از شاخص میتوزی برای تشخیص سیتوتوکسی سیتی عوامل مختلف استفاده کرده اند که بسیاری از آن ها نتایج مطلوبی را ارائه داده است (Bolte, 2004; Fernandes et al., 2007; Karaismailoglu, 2017).

گیاهان برای بقای خود در طبیعت موادی را تولید می کنند که کمتر از یک درصد وزن خشک آن ها را شامل می شود و به متابولیت های ثانویه معروف هستند. این ترکیبات شامل آلکالوئیدها، تریپنوئیدها و ترکیبات فنولی می باشند. متابولیت های ثانویه در گیاهان مختلف ممکن است در یک یا چند اندام خاص مانند ریشه، ساقه، برگ و یا گل ذخیره شوند. امروزه گیاهانی به عنوان گیاهان دارویی در نظر گرفته می شوند که دارای چند ترکیب ثانویه ی خاص در پیکره ی خود باشند و بتوان از آنها به منظور پیشگیری یا درمان بیماری های مختلف استفاده کرد (Tapsell, 2006). علی رغم صفات مطلوب و خواص متعددی که در گیاهان دارویی وجود دارد، تمام گیاهان از جمله گیاهان دارویی برای دفاع در برابر پاتوژن ها و حشرات علف خوار، ترکیباتی با خواص سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک تولید می کنند که می تواند اثرات نامطلوبی از جمله سمیت، سرطان زایی و کشندگی بر سلول ها داشته باشد. اینگونه تاثیرات بر مولکول های زیستی و حیات سلول ها معمولاً زمانی بروز می کند که این گیاهان به مدت طولانی و با دُز بالا مصرف شوند (Silva, 2011).

اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره و اسانس گیاهان دارویی، توسط آزمایش های سیتوژنتیک ارزیابی می شود. با استفاده از روش های سیتوژنتیک پارامترهایی نظیر شاخص میتوزی (نشان دهنده سیتوتوکسی سیتی) و ناهنجاری های کروموزومی (نشان دهنده

اصلی کروموزوم ها گردند (Fenech, 2002). در ادامه ی تحقیقات، Nielsen و Rank نظری ارائه دادند که ارزیابی ناهنجاری های کروموزومی به عنوان یک شاخصه معتبر برای شناسایی اثرات ژنوتوکسیک عوامل مورد آزمایش کاربرد دارد (Rank and Nielsen, 1997; De Souza et al., 2017)

سرخس پرسیاوشان با نام علمی Linn سرخس پرسیاوشان با نام علمی *Adiantum capillus-veneris*، گیاهی از خانواده Adiantaceae، یک گیاه رونده به بلندی تقریباً ۳۵ سانتی متر، دارای ساقه ی کوتاه خزنده، ریزوم رونده، دارای برگ های مرکب به طول ۷۵-۱۵ سانتی متر، دم برگ هایی به طول نیم تا یک و نیم میلی متر و برگ های بدون کرک با رنگ سبز متمایل به زرد و پهنک منشعب می باشد. (Ansari and Ekhlesi-Kazaj, 2012) آنالیز شیمیایی برگ های سرخس پرسیاوشان، نشان دهنده ی این امر است که این گیاه دارای ترکیباتی شامل فلاونوئیدها، تری ترپنوئیدها، اولثانان ها، فنیل پروپانوئیدها، کربوهیدرات ها، کاروتینوئیدها و آلیسیکلیک ها می باشد (Ishaq, 2014).

گیاه زنیان با نام علمی *Trachyspermum ammi* Linn از خانواده Apiaceae یک گیاه یک ساله ی بوته ای با ارتفاع ۹۰-۶۰ سانتی متر و انشعابات فراوان می باشد (Bairwa et al., 2012). این گیاه به طور گسترده در مناطق خشک و نیمه خشک که خاک دارای میزان بالایی از نمک است، رشد می کند. این گیاه بومی سرزمین مصر است و در کشورهای ایران، عراق، پاکستان و هند نیز کشت می شود (Ashraf, 2002; Munns, 2002).

یکی از روش های کارآمد، ارزان و قابل دسترس برای بررسی اثرات سیتوژنوتوکسیک عصاره ی گیاهان دارویی، استفاده از مریستم رأس ریشه ی برخی از گیاهان مانند پیاز، کاهو، باقلا، ذرت و جو می باشد. نتایج به دست آمده از این روش ارتباط خوبی را با سیستم های جانوری نشان می دهد؛ علاوه بر این، تولید زیاد دانه توسط این گیاهان، رشد راحت و سریع ریشه در محیط های آبی، بزرگ بودن کروموزوم ها و حساسیت بالای این گیاهان به مواد توکسیک، دلیل استفاده از این روش را بازگویی کند (Saulo, 2009; Sultan and Celik, 2009; Yekeen et al., 2017). آزمون ریشه پیاز خوراکی، به عنوان روشی کارآمد و استاندارد برای غربالگری و ارزیابی اثرات سیتوژنوتوکسیک و ژنوتوکسیک مواد شیمیایی استفاده می شود (Grant, 1982; Yavuz Kocaman and Kilic, 2018; Dutta et al., 2017). استفاده از *Allium cepa* به عنوان یک سیستم آزمایشی، اولین بار توسط Levan و برای مشاهده ی اختلال ایجاد شده توسط کلشی سین در دوک تقسیم میتوزی معرفی گردید (Levan, 1938). مدت ها بعد این محقق متوجه شد که محلول های مختلفی از نمک های آلی می توانند انواعی از ناهنجاری های کروموزومی را در سلول های مریستمی ریشه پیاز القا کنند (Levan, 1945). از سوی دیگر، مشاهده شد که برخی از ناهنجاری های کروموزومی، مانند شکستگی های کروموزومی، می توانند باعث ایجاد میکرونوکلئوس شوند، چرا که این قطعات کروموزومی جدا شده، نمی توانند در طول چرخه سلولی دوباره وارد ساختار

کومارین ها و استرول ها می باشد (Costa, 2016; Pouramir, 2011; Sameni, 2016). در پژوهشی اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره ی آبی پنج گیاه دارویی توسط تست ریشه پیاز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آنالیز ماکروسکوپی و میکروسکوپی، نشان دهنده ی ارتباط خطی و معنی دار آماری بین افزایش غلظت و کاهش رشد ریشه و شاخص میتوزی بود. همچنین مشخص شد با افزایش غلظت، درصد ناهنجاری های کروموزومی نیز افزایش یافته است (Akinboro and Bakare, 2007). در تحقیق دیگری، اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک نانوذرات نقره بر روی سلول های مریستمی ریشه پیاز، مورد ارزیابی قرار گرفت. با بالا رفتن غلظت نانوذرات نقره، ناهنجاری های کروموزومی افزایش یافته و اختلالاتی از قبیل پل کروموزومی، چسبندگی کروموزومی، متافاز تخریب شده، شکستگی های متعدد کروموزومی و تخریب سلولی دیده شد (Kumari et al., 2009; Yuet Ping, 2012). ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره ی آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان بر میزان شاخص میتوزی و ناهنجاری های کروموزومی سلول های مریستمی ریشه ی پیاز خوراکی و رشد آن از اهداف این مطالعه بود.

### مواد و روش ها

#### تهیه نمونه های گیاهی و عصاره ی آبی

سرخس پرسیاوشان از برکه گلابی منطقه داراب در استان فارس جمع آوری گردید. بذر گیاه عدس الملک و میوه ی زنیان نیز از مزرعه

مهم ترین قسمت دارویی این گیاه میوه های آن می باشد که دانه زنیان خوانده می شود (Ishwar and Singh, 2000). میوه این گیاه دارای بوی معطر و طعم تند می باشد که به طور گسترده به عنوان ادویه و طعم دهنده به مواد غذایی استفاده می شود (Sivropoulou, 1996). آنالیز فیتوشیمیایی میوه زنیان وجود ترکیباتی نظیر فیر، کربوهیدرات ها، تانن، گلیکوزیدها، ترکیبات فنولی، پروتئین ها، چربی، ساپونین ها، فلاوون ها و مواد معدنی شامل کلسیم، فسفر، آهن و نیکوتینیک اسید را نشان داده است (Bairwa et al., 2012).

گیاه عدس الملک با نام علمی *Securigera securidaca* Linn از خانواده بقولات یک گیاه علفی دولپه و یک ساله، بدون کرک و با انشعابات فراوان است که به صورت افراشته یا گسترده بر سطح زمین، با ارتفاع ۵۰-۱۰ سانتی متر دیده می شود (Garjani, 2009; Ghorbani, 2011; Hoodgar et al., 2013). کاربرد درمانی این گیاه مربوط به بذر آن می باشد که از دیرباز در طب سنتی ایران، هند و مصر به عنوان عاملی در کنترل قند خون افراد مبتلا به دیابت قندی، پایین آوردن فشار خون، کاهش دهنده ی چربی خون و در مواردی برای درمان بیماری های گوارشی مورد استفاده قرار گرفته است. مطالعات فیتوشیمیایی بر روی قسمت های مختلف این گیاه، مشخص کرده است که دانه ی آن سرشار از مواد مؤثره ی گوناگون می باشد. این ترکیبات شامل گلیکوزیدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین های نوع تری ترپنوئید استروئیدی و پنتاسیکلیک، کاردنولیدها،

باشند. جهت کنترل منفی از آب مقطر استفاده شد. بشرهای حاوی پیاز به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری گردیدند. برای تمام تیمارها سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از گذشت زمان‌های مورد نظر، میانگین رشد ریشه‌ها اندازه‌گیری شد و سپس ریشه‌ها جهت آزمایش‌های سیتوژنوتوکسیک مورد استفاده قرار گرفتند. دو میلی‌متر از قسمت مرستمی ریشه جدا گردید و در محلول فیکساتور شامل یک قسمت اسید استیک گلاسیال و سه قسمت اتانول ۹۶ درصد قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری گردید. ریشه‌ها را می‌توان به مدت سه روز در این محلول و در یخچال نگهداری کرد. برای نگاهداری طولانی مدت، ریشه‌ها به اتانول ۷۰ درصد منتقل شده و در یخچال قرار داده شدند. در این پژوهش از رنگ آمیزی فولگن استفاده شد که یک نوع رنگ آمیزی محتوای کروموزومی سلول می‌باشد که بر پایه هیدرولیز اسیدی DNA استوار است. جهت هیدرولیز، ریشه‌ها ابتدا به مدت ۲۰ دقیقه به محلول استیک اسید ۳۳ درصد منتقل شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در اسید کلریدریک یک نرمال قرار داده شدند. بعد از گذشت این زمان ظروف حاوی ریشه‌ها و اسید کلریدریک به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. حداکثر میزان رنگ‌پذیری کروموزوم‌ها به مدت زمان هیدرولیز اسیدی DNA در HCl یک نرمال بستگی دارد. تجربه نشان داد مدت ۱۰ دقیقه زمان مناسبی می‌باشد. سپس ریشه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر شست و شو داده شده

تحقیقاتی گیاهان دارویی میمند استان فارس تهیه شد. گلبرگ‌های گیاه گاوزبان ایرانی جمع‌آوری شده از استان گیلان، از شرکت پاکان بذرافشان تهیه شد. بعد از آسیاب کردن نمونه‌های مورد نظر توسط آسیاب برقی، ۲۰ گرم از بذر عدس‌الملک، برگ پرسیاوشان، میوه‌ی زنیان و گل گاوزبان در ارلن‌های جداگانه ریخته شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به هر یک اضافه گردید. ارلن‌ها توسط فویل، پوشیده شده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. سپس عصاره‌ها صاف و سانتریفیوژ گردید و تا زمان استفاده، در محیط تاریک و در یخچال نگهداری شدند. عصاره‌های به دست آمده به عنوان عصاره استاک در آزمایش‌های مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش‌های مقدماتی نشان دادند که بهترین زمان استفاده از عصاره‌ها حداکثر یک هفته می‌باشد.

#### آزمون ریشه پیاز خوراکی

جهت بررسی اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره‌های آبی بذر عدس‌الملک، برگ پرسیاوشان و میوه‌ی زنیان از ریشه‌ی پیاز خوراکی استفاده گردید. محلولهای ۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بذر عدس‌الملک، ۴ تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برگ پرسیاوشان و ۶ تا ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میوه‌ی زنیان از عصاره استاک هر کدام با استفاده از آب مقطر تهیه شد. pH محلول‌ها برابر ۶/۵ تنظیم گردید. سپس محلول‌ها درون بشرهای ۲۵ میلی‌لیتری که با فویل پوشانده شده بودند، ریخته شدند و پیازها بر روی دهانه بشر قرار داده شدند به طوری که همه‌ی ریشه‌ها در تماس با عصاره

ساختار و عملکرد پروتئین ها و حیات سلول را به همراه داشته باشد. به همین دلیل اطلاع از اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک گیاهان دارویی امری ضروری می باشد. همچنین شناسایی گیاهانی با اثر سیتوتوکسیک بالا بر رده های سلول های سرطانی می تواند به درمان انواع سرطان ها کمک شایان توجهی نماید. درصد شاخص میتوزی سلول های مریستمی ریشه ی پیاز به عنوان یک شاخصه ی میکروسکوپی و میانگین رشد ریشه به عنوان یک شاخصه ی ماکروسکوپی، می تواند به ارزیابی میزان اثرات سیتوتوکسیک یک عامل کمک قابل توجهی نماید. به طور کلی ممانعت از فعالیت میتوزی، به عنوان یک شاخصه برای نشان دادن خاصیت سیتوتوکسیک عوامل مختلف استفاده می شود (Campos, 2008; Leme and Marin-Morales, 2009).

جدول های ۱ و ۲ نشان دهنده ی تاثیر غلظت های مختلف عصاره ی آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان بر شاخص میتوزی سلول های مریستمی ریشه و میزان رشد ریشه ی پیاز در دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت می باشد. همان طور که مشخص است در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت، شاخص میتوزی در تمامی غلظت های عصاره ی آبی هر سه گیاه، اختلاف معنی داری نسبت به شاهد دارد به طوری که در همه ی غلظت های مطالعه شده، درصد شاخص میتوزی نسبت به شاهد کاهش یافته است. همچنین در تیمار ۲۴ ساعت برای عصاره ی برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان، کاهش وابسته به غلظت در شاخص میتوزی

و به مدت ۳۰ دقیقه در محلول لوکوفوشین رنگ آمیزی شدند. پس از اتمام رنگ آمیزی، ریشه ها به اسید استیک ۳۳ درصد منتقل گردیدند. جهت تهیه ی اسلاید یک قطره اسید استیک ۳۳ درصد را بر روی لام ریخته و یکی از ریشه های رنگ آمیزی شده، بر روی محلول فوق قرار داده شد و سپس لامل را به طوری که حبابی تشکیل نشود، به آرامی بر روی لام قرار داده و با انتهای خودکار به لامل ضربه وارد شد تا نمونه ی مورد نظر به طور یکنواخت بر روی لام پخش شود و سلول ها از یکدیگر جدا گردند. نمونه های تهیه شده توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی X20 مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور تعیین درصد شاخص میتوزی و ناهنجاری های کروموزومی، تعداد ۳۰۰۰ سلول برای هر تیمار شمارش گردید. درصد شاخص میتوزی از طریق تقسیم تعداد سلول های در حال تقسیم بر تعداد کل سلول ها ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد. وجود ناهنجاری های کروموزومی نظیر پل کروموزومی، شکستگی کروموزومی، آنافاز چسبنده و C-میتوز نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای محاسبه درصد ناهنجاری های کروموزومی از تقسیم تعداد سلول های در حال تقسیم با ناهنجاری کروموزومی بر تعداد کل سلول ها ضربدر ۱۰۰ استفاده گردید.

### نتایج و بحث

علیرغم صفات مطلوب گیاهان دارویی، به دلیل وجود ترکیباتی از قبیل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها و ترکیبات فنولی در گیاهان، استفاده نادرست از آنها می تواند عوارض متعددی از جمله تاثیر نامطلوب بر محتوای ژنتیکی سلول،



۴۸ ساعت، بیشترین  $IC_{50}$  مربوط به عصاره ی بذر عدس الملک بوده و کمترین مقدار در تیمار ۴۸ ساعت مربوط به عصاره برگ پرسیاوشان می باشد.  $IC_{50}$  در تیمار ۲۴ ساعت عصاره ی برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان اختلاف چندانی با یکدیگر ندارند.

طبق نظر Compos و همکاران، کاهش معنی دار شاخص میتوزی نسبت به شاهد، ناشی از واکنش یک عامل شیمیایی با ماکرومولکول های زیستی و در نتیجه تداخل در رشد و نمو سلول می باشد (Campos, 2008). کاهش شاخص میتوزی می تواند تحت عوامل مختلف از جمله توقف سلول در ایتترفاز و عدم امکان ورود به فاز میتوز، مسدود شدن فاز  $G_1$  و  $G_2$ ، ممانعت از سنتز پروتئین و DNA در فاز سنتز و تاخیر یا توقف در هر کدام از فاز های میتوز صورت پذیرد (Majewska, 2003). در پژوهشی، اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره ی آبی پنج گیاه دارویی *Azardirachta indica*، *Morinda lucida*، *Cymbopogon citratus*، *Mangifera indica* و *Carica papaya* توسط تست ریشه پیاز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده از آنالیز ماکروسکوپی و میکروسکوپی، نشان دهنده ی یک ارتباط خطی و معنی دار آماری بین افزایش غلظت و کاهش رشد ریشه و شاخص میتوزی بود (Akinboro and Bakare, 2007). در پژوهش دیگری که بر روی اثرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک گیاه کدو توسط تست ریشه پیاز انجام شد، نتایج به دست آمده به طور معنی داری نشان دهنده ی اثر مهارى عصاره این گیاه بر رشد ریشه و شاخص

مشاهده می شود که این امر در تیمار ۴۸ ساعت برای هر سه گیاه صدق می کند. تعداد سلول ها در مراحل مختلف تقسیم در تمامی غلظت های هر سه گیاه مطالعه شده در دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت، نشان می دهد که پروفاز با اختلاف زیادی نسبت به سایر مراحل میتوز، بالاترین تعداد را به خود اختصاص داده است. در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت عصاره ی برگ پرسیاوشان، ارتباط معنی دار آماری بین افزایش غلظت عصاره و کاهش رشد ریشه وجود دارد. از طرفی از غلظت ۲۰ تا ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ی بذر عدس الملک، کاهش معنی داری در رشد ریشه برای هر دو زمان تیمار مشاهده نمی شود. همچنین برای عصاره ی میوه ی زنیان، در غلظت ۲۴ و ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر تیمار ۲۴ ساعت و از غلظت ۱۸ تا ۳۰ میلی گرم بر میلی لیتر تیمار ۴۸ ساعت، اختلاف معنی داری در رشد ریشه وجود ندارد. جدول ۳ نشان دهنده ی درصد شاخص میتوزی و میانگین رشد ریشه های تیمار شده با عصاره ی گیاهان مطالعه شده، نسبت به شاهد می باشد. همان طور که مشخص است در هر سه گیاه مورد مطالعه، میزان شاخص میتوزی و میانگین رشد ریشه در تیمار ۴۸ ساعت در مقایسه با تیمار ۲۴ ساعت کاهش بیشتری نسبت به شاهد داشته است.  $IC_{50}$  (The half maximal inhibitory concentration) به دست آمده برای هر سه گیاه، در جدول ۴ آورده شده است. همانطور که مشخص است  $IC_{50}$  به دست آمده در تیمار ۴۸ ساعت برای هر سه گیاه مورد مطالعه کمتر از  $IC_{50}$  در تیمار ۲۴ ساعت می باشد. همچنین در هر دو تیمار ۲۴ و

شکل ۲ و ۳ نیز نمایانگر انواع ناهنجاری های کروموزومی مشاهده شده در این مطالعه می باشد. از جمله ناهنجاری های کروموزومی مشاهده شده می توان به متافاز تخریب شده (C-میتوز)، چسبندگی کروموزومی، پلی پلوئیدی، شکستگی و جداشدگی کروموزومی، آنافاز تخریب شده، آنافاز ستاره ای، پل کروموزومی، هسته دارای جوانه ی هسته ای، هسته ی تخریب شده و میکرونوکلئوس اشاره

میتوزی سلول های مریستمی ریشه ی پیاز بود. همچنین ریشه های تیمار شده در غلظت های بالا، از لحاظ رنگ و مورفولوژی، تغییراتی نشان داده بودند. از آنجا که گیاه کدو سرشار از تری ترپنوئیدها می باشد، خاصیت سیتوتوکسیک این گیاه را به این ترکیبات نسبت داده اند (Bhattacharya and Halder, 2012).

شکل ۱ هسته ی سلول در اینترفاز و مراحل مختلف میتوز در گروه شاهد را نشان می دهد.

جدول ۱- بررسی اثر غلظتهای مختلف عصاره های آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوهی زنیان بر مراحل مختلف چرخه سلولی، شاخص میتوزی سلولهای مریستمی ریشه و رشد ریشه پیاز خوراکی در تیمار ۲۴

ساعت

نام گیاه مورد مطالعه	غلظت عصاره (میلیگرم بر میلی لیتر)	درصد شاخص میتوزی ریشه + خطای استاندارد	میانگین رشد ریشه + خطای استاندارد	تعداد سلولها در فازهای مختلف تقسیم	
				آنافاز + تلوفاز	متافاز
عدس الملک	شاهد	۳۳/۱۳±۰/۵۸ <sup>a</sup>	۱۳/۶±۰/۶ <sup>a</sup>	۱۴۱	۷۲
	۱۰	۲۴/۱۳±۰/۲۵ <sup>b</sup>	۱۰/۱±۰/۴ <sup>b</sup>	۲۷	۱۸
	۲۰	۱۱/۱۰±۱/۰۵ <sup>c</sup>	۶/۳±۰/۲ <sup>c</sup>	۱۲	۶
	۳۰	۱۰/۶۰±۰/۹۶ <sup>c</sup>	۵/۹±۰/۱ <sup>c</sup>	۱۵	۱۲
	۴۰	۹/۴۳±۰/۰۵ <sup>c</sup>	۵/۷±۰/۰ <sup>c</sup>	۶	۱۸
	۵۰	۵/۴۷±۰/۳۵ <sup>d</sup>	۱/۸±۰/۱ <sup>d</sup>	۹	۱۸
پرسیاوشان	۴	۲۱/۳۳±۰/۵۲ <sup>b</sup>	۱۰/۲±۰/۶ <sup>b</sup>	۱۴۴	۵۴
	۸	۱۵/۹۶±۰/۸۴ <sup>c</sup>	۸/۰±۰/۲ <sup>c</sup>	۵۴	۲۴
	۱۲	۱۳/۶۳±۱/۰۷ <sup>d</sup>	۶/۱±۰/۳ <sup>d</sup>	۵۷	۳۰
	۱۶	۹/۷۷±۰/۴۲ <sup>e</sup>	۳/۹±۰/۳ <sup>e</sup>	۳۰	۲۴
	۲۰	۵/۰۷±۰/۴۴ <sup>f</sup>	۱/۵±۰/۲ <sup>f</sup>	۲۷	۱۵
	زنیان	۶	۱۸/۷۶±۰/۴۷ <sup>b</sup>	۹/۶±۰/۱ <sup>b</sup>	۷۲
۱۲		۱۰/۶۰±۰/۴۲ <sup>c</sup>	۴/۹±۰/۳ <sup>c</sup>	۳۶	۲۷
۱۸		۷/۲۳±۰/۱۸ <sup>d</sup>	۳/۳±۰/۱ <sup>d</sup>	۲۷	۱۲
۲۴		۶/۹۳±۰/۰۸ <sup>de</sup>	۲/۴±۰/۱ <sup>e</sup>	۳۰	۳۳
۳۰		۵/۸۰±۰/۲۶ <sup>e</sup>	۱/۸±۰/۱ <sup>e</sup>	۱۲	۶

\* اعداد با حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ( $\alpha \leq 0.05$ ) دارای اختلاف معنی دار میباشد. هر عدد میانگین سه تکرار  $\pm$  standard error میباشد. در هر تیمار ۳۰۰۰ سلول شمارش گردیده است.



جدول ۲- بررسی اثر غلظت های مختلف عصاره های آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان بر مراحل مختلف چرخه سلولی، شاخص میتوزی سلول های مرستمی ریشه و رشد ریشه پیاز خوراکی در تیمار ۴۸ ساعت

نام گیاه مورد مطالعه	غلظت عصاره (میلی‌گرم بر میلی لیتر)	درصد شاخص میتوزی ریشه + خطای استاندارد	میانگین رشد ریشه + خطای استاندارد	تعداد سلولها در فازهای مختلف تقسیم	
				آنافاز + تلوفاز	متافاز
عدس الملک	شاهد	۳۴/۳۱±۰/۵۸ <sup>a</sup>	۲۴/۵±۱/۴ <sup>a</sup>	۱۰۵	۶۹
	۱۰	۲۱/۹۰±۰/۲۶ <sup>b</sup>	۱۲/۶±۰/۸ <sup>b</sup>	۳۰	۲۱
	۲۰	۱۱/۱۳±۰/۷۴ <sup>c</sup>	۷/۴±۰/۲ <sup>c</sup>	۹	۶
	۳۰	۷/۹۳±۰/۶۷ <sup>d</sup>	۶/۴±۰/۲ <sup>c</sup>	۱۲	۹
	۴۰	۶/۰۳±۰/۲۳ <sup>e</sup>	۵/۹±۰/۰ <sup>c</sup>	۳	۶
	۵۰	۳/۹۳±۰/۴۶ <sup>f</sup>	۲/۴±۰/۲ <sup>d</sup>	۳	۱۲
پرسیاوشان	۴	۱۷/۸۳±۰/۳۵ <sup>b</sup>	۱۱/۹±۰/۴ <sup>b</sup>	۵۷	۶۹
	۸	۱۲/۸۳±۰/۱۸ <sup>c</sup>	۹/۴±۰/۳ <sup>c</sup>	۳۶	۴۵
	۱۲	۸/۱۰±۰/۱۵ <sup>d</sup>	۷/۳±۰/۳ <sup>d</sup>	۳۳	۱۸
	۱۶	۵/۹۳±۰/۰۸ <sup>e</sup>	۵/۱±۰/۲ <sup>e</sup>	۲۱	۱۵
	۲۰	۳/۶۰±۰/۱۵ <sup>f</sup>	۱/۹±۰/۱ <sup>f</sup>	۱۵	۹
	زنیان	۶	۱۶/۷۲±۰/۳۴ <sup>b</sup>	۱۲/۵±۰/۴ <sup>b</sup>	۳۶
۱۲		۷/۷۰±۰/۲۹ <sup>c</sup>	۵/۸±۰/۲ <sup>c</sup>	۲۷	۹
۱۸		۵/۹۳±۰/۲۳ <sup>d</sup>	۳/۸±۰/۱ <sup>d</sup>	۱۶	۳
۲۴		۴/۸۴±۰/۱۸ <sup>e</sup>	۲/۶±۰/۱ <sup>de</sup>	۲۷	۳
۳۰		۳/۹۱±۰/۰۹ <sup>e</sup>	۱/۹±۰/۸ <sup>e</sup>	۱۲	۳

\* اعداد با حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ( $\alpha \leq 0.05$ ) دارای اختلاف معنی دار می باشد. هر عدد میانگین سه تکرار  $\pm$  standard error می باشد. در هر تیمار ۳۰۰۰ سلول شمارش گردیده است.

تخریب شده نیز آورده شده است. همان طور که مشخص است در هر دو زمان تیمار، عصاره ی بذر عدس الملک بیشترین ناهنجاری های کروموزومی را سبب گردیده است. در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت هر سه گیاه مورد مطالعه، ارتباط معنی داری بین افزایش غلظت عصاره و درصد ناهنجاری های کروموزومی مشاهده نمی

کرد. جدول های ۵ و ۶ نشان دهنده ی تعداد هر یک از انواع ناهنجاری های کروموزومی در ۳۰۰۰ سلول شمارش شده و درصد ناهنجاری کروموزومی گیاهان مورد مطالعه برای دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت می باشد. همچنین تعداد سلول های دارای میکرونوکلئوس و هسته ی

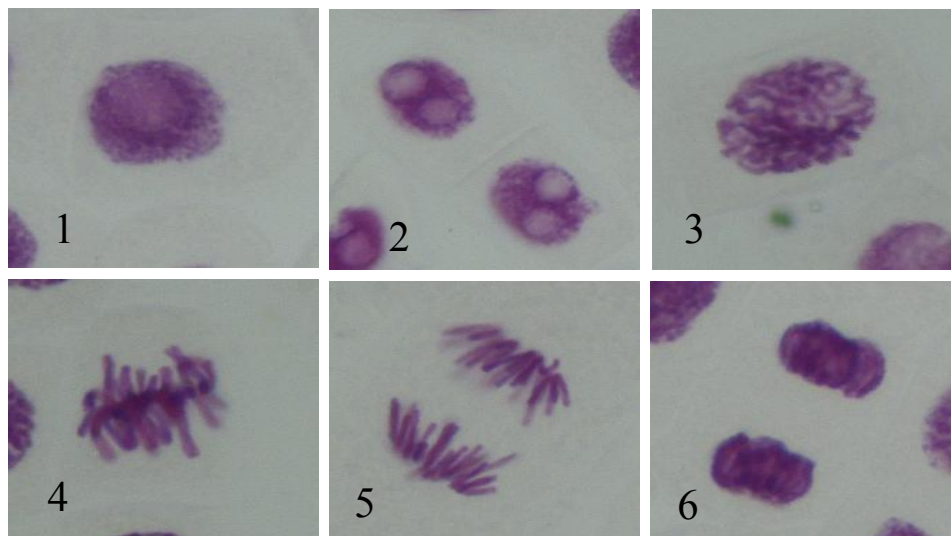
عدس الملک، برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان بر میزان رشد ریشه ی پیاز در گیاه عدس الملک از بقیه بیشتر بوده است (جدول ۴). تاثیر عصاره ی آبی گیاهان مطالعه شده بر میزان ناهنجاری های کروموزومی سلول های مریستمی ریشه پیاز نیز بررسی شد. ناهنجاری های کروموزومی در واقع هر گونه تغییر در ساختار کروموزوم یا تعداد کل کروموزوم ها می باشد که می تواند خود به خود یا در اثر یک عامل فیزیکی یا شیمیایی رخ دهد (Leme and Marin-Morales, 2009). تغییر در ساختار کروموزوم ها ممکن است توسط چندین رخداد متفاوت از جمله

شود. در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت، بالاترین غلظت عصاره ی آبی هر سه گیاه مورد مطالعه، دارای بیشترین تعداد سلول با هسته ی تخریب شده می باشند. درصد میکرونوکلئوس در تمامی تیمارها ارتباط معنی داری با غلظت عصاره نشان نمی دهد. همچنین در تیمار ۴۸ ساعت عصاره ی برگ پرسیاوشان، میکرونوکلئوس فقط در غلظت های ۴ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده می شود. نتایج به دست آمده از این آزمایش هیچ گونه ناهنجاری کروموزومی را در شاهد نشان نداد.

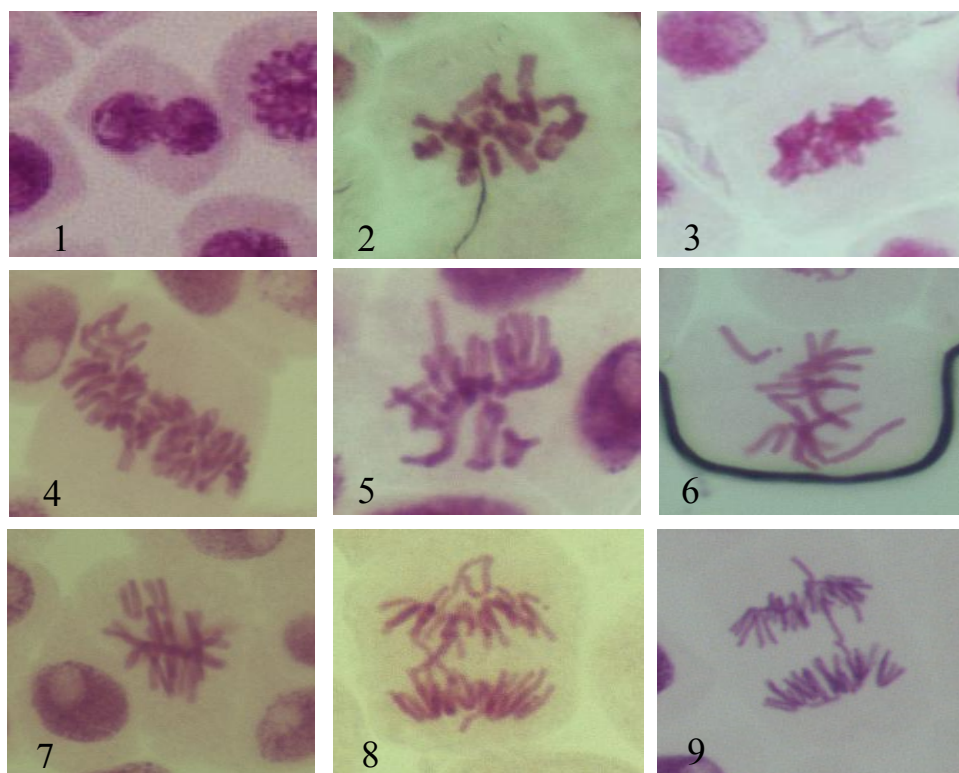
IC<sub>50</sub> حاصل از تاثیر عصاره های آبی بذر

جدول ۳- درصد شاخص میتوزی سلول های مریستمی و میانگین رشد ریشه های تیمار شده با عصاره ی آبی گیاهان نسبت به شاهد در دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت

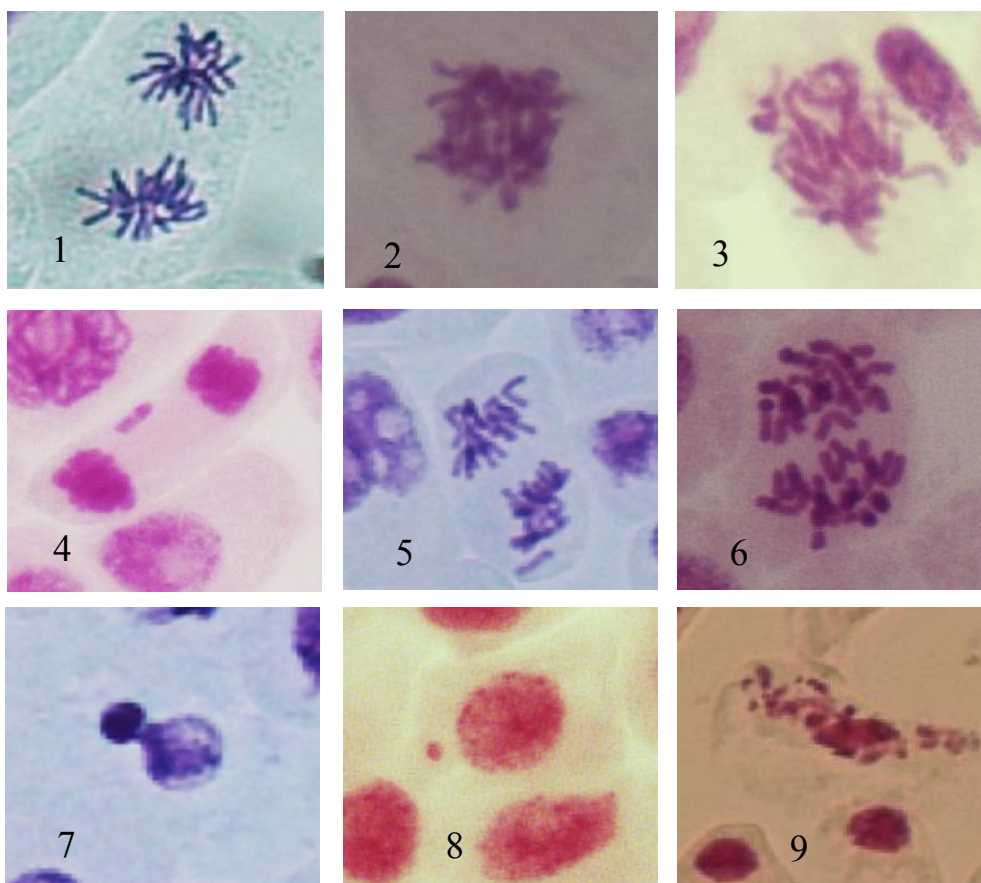
گیاه مطالعه شده	غلظت عصاره (میلی گرم بر میلی لیتر)		درصد شاخص میتوزی سلول های مریستمی ریشه نسبت به شاهد		درصد رشد ریشه نسبت به شاهد
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	
شاهد	۰	۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
	۱۰	۶۳/۸	۷۲/۸	۵۱/۳	۷۴/۳
	۲۰	۳۲/۴	۳۳/۵	۳۰/۲	۴۶/۳
عدس الملک	۳۰	۲۳/۱	۳۲/۰	۲۶/۱	۴۳/۴
	۴۰	۱۷/۶	۲۸/۵	۲۴/۱	۴۱/۹
	۵۰	۱۱/۴	۱۶/۵	۹/۸	۱۳/۲
پرسیاوشان	۴	۵۲/۰	۶۴/۴	۴۸/۶	۷۵/۰
	۸	۳۷/۴	۴۸/۲	۳۸/۴	۵۸/۸
	۱۲	۲۳/۶	۴۱/۱	۲۹/۸	۴۴/۸
زنیان	۱۶	۱۷/۳	۲۹/۵	۲۰/۸	۲۸/۷
	۲۰	۱۰/۵	۱۵/۳	۷/۷	۱۱/۰
	۶	۴۸/۸	۵۶/۶	۵۱/۰	۷۰/۶
زنیان	۱۲	۲۲/۴	۳۲/۰	۲۳/۷	۳۶/۰
	۱۸	۱۷/۳	۲۱/۸	۱۵/۵	۲۴/۳
	۲۴	۱۴/۱	۲۰/۹	۱۰/۶	۱۷/۶
	۳۰	۱۱/۴	۱۷/۵	۷/۷	۱۳/۲



شکل ۱- ایتترفاز و مراحل مختلف میتوز در گروه شاهد. ایتترفاز (1 و 2)، پروفاز (3)، متافاز (4)، آنافاز (5)، تلوفاز (6).



شکل ۲- ناهنجاریهای کروموزومی مشاهده شده در تیمار ریشه ی پیاز خوراکی با عصاره ی آبی گیاهان. سلول دارای دو هسته (1)، متافاز تخریب شده (2)، چسبندگی کروموزومی در متافاز (3)، پلی پلوئیدی در متافاز (4)، جداسدگی کروموزومی در متافاز (5)، شکستگی و جداسدگی کروموزومی در متافاز (6)، جداسدگی کروموزومی در متافاز (7) و پل کروموزومی در آنافاز (8 و 9).



شکل ۳- ناهنجاریهای دیگر کروموزومی مشاهده شده در تیمار ریشه ی پیاز خوراکی با عصاره ی آبی گیاهان. آنافاز ستارهای (1)، چسبندگی کروموزومی در آنافاز (2 و 3)، جداشدگی کروموزومی در تلوفاز (4)، جداشدگی کروموزوم در آنافاز (5)، آنافاز تخریب شده (6)، جوانه هسته ای (7)، میکرونوکلیئوس (8) و هسته ی تخریب شده (9).

جدول ۴-  $IC_{50}$  حاصل از تاثیر عصاره های آبی بذر عدس الملک، برگ پرسیاوشان و

میوه ی زنیان بر میزان رشد ریشه ی پیاز خوراکی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار

گیاه مورد مطالعه	$IC_{50}$ ( میلی گرم بر میلی لیتر)	
	تیمار ۲۴ ساعت	تیمار ۴۸ ساعت
عدس الملک	۲۱/۴۶	۱۰/۳۴
پرسیاوشان	۹/۱۷	۴/۰۱
زنیان	۹/۳۸	۶/۰۷

ی هر سه گیاه مطالعه شده در تیمار ۲۴ ساعت اختلاف معنی داری نسبت به شاهد دارد. همچنین این امر در رابطه با تیمار ۴۸ ساعت، به جز غلظت های ۱۲ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره ی برگ پرسیاوشان، صدق می کند. تغییر وابسته به غلظتی در درصد ناهنجاری های کروموزومی ریشه ی پیاز برای هر سه گیاه مطالعه شده در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت دیده نمی شود. افزایش غلظت عصاره ی هر سه گیاه مطالعه شده، تاثیری بر میزان ناهنجاری های کروموزومی ایجاد شده در سلول های مریستمی ریشه ی پیاز نداشته است. با توجه به انواع ناهنجاری های کروموزومی مشاهده شده در این پژوهش شامل متافاز و آنافاز تخریب شده (C-میتوز)، چسبندگی کروموزومی در متافاز و آنافاز، شکستگی و جدا شدگی کروموزوم، پل کروموزومی، آنافاز ستاره ای و پلی پلوئیدی می باشد که در سلول های مریستمی ریشه پیاز تیمار شده با بذر عدس الملک تمامی انواع ناهنجاری های، دیده می شود. در صورتی که در ریشه های تیمار شده با میوه ی زنیان، آنافاز ستاره ای و در برگ پرسیاوشان آنافاز چسبنده، آنافاز تخریب شده و پلی پلوئیدی دیده نشد. بالاترین تعداد ناهنجاری های کروموزومی مربوط به چسبندگی کروموزومی در متافاز و متافاز تخریب شده (C-میتوز) می باشد. تعداد هسته های تخریب شده در اکثر تیمارها، با افزایش غلظت عصاره، افزایش یافته است. وجود هسته های تخریب شده نشان از مرگ سلولی دارد. با توجه به داده های به دست آمده در این پژوهش، می توان گفت افزایش غلظت عصاره ی گیاهان

شکست در DNA، مهار سنتز DNA و رونویسی از DNA تغییر یافته صورت پذیرد. ناهنجاری های کروموزومی عددی مانند آنیوپلوئیدی و پلی پلوئیدی نیز می توانند در نتیجه ی تفکیک غیرطبیعی کروموزوم ها به صورت خود به خود یا در اثر فعالیت عوامل آنیوژن رخ دهند (Lubini, 2008). درصد ناهنجاری های کروموزومی و تعداد هر کدام از انواع ناهنجاری های ایجاد شده در سلول های مریستمی ریشه ی پیاز در جدول های ۵ و ۶ آورده شده است. داده ها نشان دهنده ی آن است که شاهد فاقد هر گونه ناهنجاری کروموزومی می باشد. همان طور که مشخص است عصاره ی آبی بذر عدس الملک در هر دو تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت بازه ی غلظتی آزمایش شده، درصد بالایی از ناهنجاری های کروموزومی و در نتیجه تعداد زیادی از سلول های دارای میکرونوکلئوس را در سلول های مریستمی ریشه ی پیاز القا کرده است. در صورتی که عصاره ی برگ پرسیاوشان و میوه ی زنیان در غلظت های مطالعه شده، در مقایسه با بذر عدس الملک درصد پایین تری از اثرات ژنوتوکسیک را از خود نشان می دهند به طوری که گیاه پرسیاوشان در غلظت های ۱۲ و ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر تیمار ۴۸ ساعت هیچ گونه ناهنجاری کروموزومی را نشان نداده است و اختلافی با شاهد ندارد. همچنین در تیمار ۴۸ ساعت عصاره ی برگ پرسیاوشان، سلول های دارای میکرونوکلئوس فقط در غلظت های ۴ و ۸ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده می شود. داده ها نشان دهنده آن است که درصد ناهنجاری های کروموزومی در تمامی غلظت های عصاره

مطالعه شده، موجب افزایش مرگ سلول های  
 مریستمی ریشه ی پیاز شده است.  
 وجود C-میتوز (colchicin-like mitosis)  
 نشان دهنده ی وجود ترکیباتی است که با  
 تخریب میکروتوبول های تشکیل دهنده ی  
 دوک، از شکل گیری دوک تقسیم جلوگیری  
 می کند؛ همانند عملی که کلشی سین انجام

می دهد. القاء C-میتوز معمولا در اثر ممانعت  
 از تشکیل دوک تقسیم یا تخریب آن می باشد.  
 این امر معمولا یک تاثیر برگشت پذیر در سلول  
 بوده و نشان دهنده ی سمیت ضعیف ماده ی  
 آزمایش شده می باشد. C-میتوز می تواند در  
 متافاز و به میزان کمتری در آنافاز رخ دهد  
 (Tkalec, 2009). چسبندگی کروموزومی یک

جدول ۵- تاثیر عصاره آبی گیاهان مورد مطالعه بر ناهنجاری های کروموزومی در مریستم ریشه پیاز (تیمار ۲۴ ساعت)

تعداد سلول - ها یا هسته تخریب شده	درصد سلول های دارای ناهنجاری کروموزومی	تعداد انواع ناهنجاری های کروموزومی							غلظت عصاره مورد مطالعه (mg/ml)	نام گیاه مورد مطالعه		
		C.M.	S.M.	C.L.	CB.	S.A.	ST.A.	D.A.			P.P.	M.N.
۰	۰/۰۰ <sup>۵</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	
۷	۲/۱۰ ± ۰/۱۴ <sup>۵</sup>	۱۱	۳۲	۱۵	۶	۸	۹	۲	۰	۴۰	۱۰	
۶	۲/۵۶ ± ۰/۱۱ <sup>۵</sup>	۸	۲۵	۲	۱	۱	۶	۵	۵	۲۴	۲۰	
۱۶	۳/۱۶ ± ۰/۱۳ <sup>۵</sup>	۱۷	۳۳	۰	۳	۳	۷	۳	۳	۳۳	۳۰	عدهس المک
۱۵	۳/۱۰ ± ۰/۰۷ <sup>۵</sup>	۷	۱۸	۳	۲	۱	۳	۲	۰	۵۷	۴۰	
۲۷	۶/۱۳ ± ۰/۰۷ <sup>۵</sup>	۰	۱۷	۰	۱۶	۰	۰	۰	۰	۱۵۱	۵۰	
۰	۰/۰۰ <sup>۵</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	
۱	۰/۹۳ ± ۰/۰۵ <sup>۵</sup>	۱	۸	۱	۱	۲	۰	۰	۰	۱۵	۴	
۴	۰/۳۳ ± ۰/۰۵ <sup>۵</sup>	۱	۳	۰	۲	۱	۰	۰	۰	۳	۸	
۵	۰/۲۴ ± ۰/۰۶ <sup>۵</sup>	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴	۱۲	پرسیاوشان
۲۹	۰/۲۳ ± ۰/۳۳ <sup>۵</sup>	۲	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	۱۶	
۶۷	۰/۰۷ ± ۰/۰۶ <sup>۵</sup>	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۰	
۰	۰/۰۰ <sup>۵</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	
۴	۰/۶۷ ± ۰/۱۳ <sup>۵</sup>	۴	۶	۱	۱	۰	۱	۱	۰	۶	۶	
۳	۰/۴۷ ± ۰/۱۴ <sup>۵</sup>	۴	۳	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۵	۱۲	
۷	۰/۵۷ ± ۰/۱۴ <sup>۵</sup>	۲	۳	۱	۰	۰	۰	۱	۰	۳	۱۸	زنبان
۱۱	۰/۳۰ ± ۰/۰۴ <sup>۵</sup>	۲	۲	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۴	۲۴	
۲۰	۰/۱۷ ± ۰/۰۲ <sup>۵</sup>	۱	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۳۰	

\* اعداد با حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دالکن ( $\alpha \leq 0.05$ ) دارای اختلاف معنی دار میباشد. هر عدد میانگین سه تکرار  $\pm$  standard error در هر تیمار  
 ۳۰۰۰ سلول شمارش گردیده است. C-میتوز (C.M.)، چسبندگی کروموزومی در متافاز (S.M.)، شکستگی و جداشدگی کروموزومی (C.L.)، پل کروموزومی (C.B.)، آنافاز  
 ستاره‌های (S.A.)، آنافاز چسبیده (S.T.A.)، آنافاز تخریب شده (D.A.)، پلیپلئیدی (P.P.)



جدول ۶- تاثیر عصاره آبی گیاهان مورد مطالعه بر ناهنجاری های کروموزومی در مریستم ریشه پیاز (تیمار ۴۸ ساعت)

تعداد سلولها با هسته تخریب شده	درصد سلول های دارای ناهنجاری کروموزومی	تعداد انواع ناهنجاری های کروموزومی										غلظت عصاره (mg/ml)	نام گیاه مورد مطالعه	
		CM	S.M.	CL	C.B.	S.A.	ST.A.	D.A.	P.P.	M.N.				
۰	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	عاش الملوک
۸	۹/۳۶ ± ۰/۷۰ <sup>a</sup>	۴۷	۷۷	۰	۱۸	۰	۹	۳	۰	۱۲۷	۱۰	۱۲۷	۱۰	
۵	۸/۳۶ ± ۰/۸۰ <sup>b</sup>	۳۳	۲۵	۴	۰	۰	۱	۱۴	۰	۱۷۵	۲۰	۱۷۵	۲۰	
۳۴	۵/۱۳ ± ۰/۱۱ <sup>c</sup>	۱۳	۱۱	۱	۳	۰	۴	۱	۱	۱۲۰	۳۰	۱۲۰	۳۰	
۴۱	۵/۶۳ ± ۰/۲۱ <sup>c</sup>	۵	۱۶	۳	۳	۰	۲	۴	۱	۱۳۴	۴۰	۱۳۴	۴۰	
۹۴	۶/۵۳ ± ۰/۳۷ <sup>d</sup>	۱۰	۴	۰	۴	۰	۰	۰	۰	۱۷۷	۵۰	۱۷۷	۵۰	
۰	۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	پرسیاوشان
۲۲	۰/۶۷ ± ۰/۰۲ <sup>a</sup>	۴	۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۹	۴	۹	۴	
۲۰	۰/۴۳ ± ۰/۰۸ <sup>b</sup>	۴	۴	۴	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۸	۱	۸	
۴۲	۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲	۰	۱۲	
۵۲	۰/۱۰ ± ۰/۰۱ <sup>c</sup>	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۶	۰	۱۶	
۶۴	۰/۰۰ <sup>d</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲۰	۰	۲۰	
۰	۰/۰۰ <sup>e</sup>	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	شاهد	زیتان
۶	۰/۹۰ ± ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۲	۴	۳	۲	۰	۰	۲	۰	۱۴	۶	۱۴	۶	
۵	۰/۷۷ ± ۰/۰۶ <sup>b</sup>	۲	۳	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۱۶	۱۲	۱۶	۱۲	
۱۰	۰/۳۳ ± ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۰	۲	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۷	۱۸	۷	۱۸	
۲۷	۰/۷۷ ± ۰/۰۵ <sup>b</sup>	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۰	۲۰	۲۴	۲۰	۲۴	
۲۴	۰/۱۰ ± ۰/۰۱ <sup>d</sup>	۰	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۲۰	۱	۲۰	

\* اعداد با حروف متفاوت در هر ستون بر اساس آزمون دانکن ( $\alpha \leq 0.05$ ) دارای اختلاف معنی دار میباشند. هر عدد میانگین سه تکرار  $\pm$  standard error میباشند. در هر تیمار ۳۰۰۰ سلول شمارش گردیده است. C-چیتوز (C.M)، چسبندگی کروموزومی در متافاز (S.M)، شکستگی و جداشدگی کروموزومی (C.L)، پل کروموزومی (C.B)، آنافاز ستاره‌های (S.A)، آنافاز چسبنده (S.T.A)، آنافاز تخریب شده (D.A)، پلیپلوئیدی (P.P).

نشانه‌ی رایج برای نفوذ مواد سمی در سلول و تاثیر آن بر روی کروموزوم‌ها است. جهش در پروتئین‌های غیر هیستونی که برای تفکیک کروموزوم‌ها در میتوز ضروری می‌باشد، باعث ایجاد چسبندگی کروموزومی می‌شود. این نوع از ناهنجاری می‌تواند در متافاز و آنافاز رخ دهد

(Kumari et al., 2009). جداشدگی کروموزوم از محتوای ژنتیکی و حرکت آزادانه آن در سلول موسوم به *vagrant chromosome* می‌تواند در اثر عدم اتصال کروموزوم به دوک تقسیم در متافاز یا جدا شدن آن از دوک، در متافاز یا آنافاز رخ دهد (Tkalec, 2009). پل کروموزومی به دلیل

عصاره ی آبی گیاهان *Inula, Euphorbia hirta*, *Morinda*, *Azadirachta indica, viscosa*, *Mangifera*, *Cymbopogon citratus*, *lucida* بر سلول های مریستمی ریشه پیاز خوراکی انجام شد نتایج به دست آمده نشان دهنده ی وجود ناهنجاری های کروموزومی در این سلول ها بود (Soliman, 2001; Akinboro and Bakare, 2007; Yuet Ping, 2012). مطالعات متعددی، نشان دهنده ی تاثیر عصاره ی آبی گیاهان مختلف در القای تشکیل میکرونوکلئوس می باشد. به طور مثال اثر عصاره ی آبی *Lavandula stoechas* و عصاره میوه *Ecballium elaterium* در القای تشکیل میکرونوکلئوس در سلول های مریستمی ریشه پیاز نشان داده شده است. (Çelik and Aslantürk, 2007; Çelik and Aslantürk, 2009) همچنین اثر عصاره ی آبی درخت چریش از تیره سنجید تلخیان با نام علمی *Azadirachta indica* در تشکیل میکرونوکلئوس در سلول های رأس ریشه ی پیاز گزارش شد. سایرین نیز تشکیل MN توسط تیمار با عصاره ی تعدادی از گونه های جنس *Psychotria* را بر مریستم ریشه پیاز گزارش کردند (Akinboro and Bakare, 2007). نتیجه بررسی اثرات ژنوتوکسیک عصاره برگ گیاه *Amaranthus spinosus* توسط تست ریشه پیاز، مشخص کرد که عصاره برگ این گیاه دارای اثرات ژنوتوکسیک کاملاً مشخصی بر سلول های مریستم ریشه می باشد و سطح بالایی از اثرات کلاستوزن در بررسی ژنوتوکسی سیتی مشاهده شد (Prajitha and Thoppil, 2016).

چسبندگی کروماتید دو کروموزوم به خصوص کروموزوم های خواهری و عدم جدا شدن دو کروموزوم در مرحله ی آنافاز رخ می دهد که ممکن است تا آخر تلوفاز نیز ادامه پیدا کند. اگر این اتصال بیش از حد قوی باشد، کروماتیدها می توانند در نزدیکی نقطه ی اتصال بشکنند (Gömürgen, 2005). پل کروموزومی ایجاد شده می تواند باعث تغییراتی در ساختار کروموزوم گیاهان زراعی شود (Sameni, 2016).

آنافاز ستاره ای اصطلاحاً به بازآرایی کروموزوم ها در قطبین سلول گفته می شود به طوری که از قسمت سانترومر به سمت یکدیگر کشیده شده و یک تجمع کروموزومی ستاره مانند ایجاد می کنند. این نوع از ناهنجاری نیز در اثر اختلال در ساختار و عملکرد دوک تقسیم اتفاق می افتد (Lehnen et al., 1990). تشکیل میکرونوکلئوس توسط بسیاری از محققین یک شاخصه ی ساده ولی در عین حال مؤثر برای آنالیز تاثیرات موتاژنیک یک عامل شیمیایی در نظر گرفته شده است (Leme and Marin- Morales, 2009; Campos, 2008; Juchimiuk et al., 2007). میکرونوکلئوس در نتیجه تاثیرات کلاستوزن یا آنیوژن یک عامل در سلول رخ می دهد و می تواند به صورت یک ساختار شبه هسته ای کوچک در سلول های نسل بعد ظهور کند. بنابراین میکرونوکلئوس در نتیجه رخداد ناهنجاری هایی از قبیل شکست کروموزومی، جداشدگی کروموزوم از دوک تقسیم و آنیوپلوئیدی ایجاد می شود (Leme and Marin- Morales, 2009).

در مطالعاتی که بر روی خواص ژنوتوکسیک

ترویجی مهم دیگر این مطالعه این است که مصرف گیاهان بررسی شده باید با احتیاط و در حد مجاز که شامل دُز مورد نیاز هر فرد و بیماری می باشد و توسط متخصص مربوطه تعیین می گردد، مصرف شود و بر روی سایر گیاهان دارویی مورد استفاده نیز مطالعات مشابه ای انجام شود.

به طور کلی می توان نتیجه گرفت که آزمون ریشه ی پیاز خوراکی یک روش سریع، حساس و کارآمد برای ارزیابی خواص سیتوتوکسیک، ژنوتوکسیک و موتاژنیک عصاره ی گیاهان دارویی می باشد. علاوه بر این، ارزیابی چندین شاخصه ی ژنتیکی توسط این آزمون، این امکان را می دهد که مکانیسم عمل عوامل آزمایش شده بر DNA و تقسیم سلولی مورد بررسی قرار گیرد. لازم به ذکر است که از این آزمون نمی توان به عنوان یک آزمون تخصصی نام برد. زیرا ممکن است تاثیر عوامل مختلف بر سلول های گیاهی و جانوری تفاوت هایی با یکدیگر داشته باشد. با این حال یک عامل خاص که بتواند در یک گروه ایجاد مشکلات کروموزومی نماید، به طور کلی می تواند در گروه دیگر نیز این امر را القا کند (Grant, 1982). از این آزمون می توان در کنار سایر آزمون های تخصصی برای به دست آوردن اطلاعاتی جامع تر و کامل تر در خصوص تاثیرات سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عوامل مختلف، استفاده کرد.

### یافته های ترویجی:

بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره های خام گیاهی به روش های مذکور در این پژوهش هزینه کمتری داشته، حساسیت بیشتری دارا بوده و آزمایش در زمان کوتاه قابل انجام است از طرفی مقدار نمونه مورد نیاز برای آزمایش نیز کمتر است و اطلاعات کاربردی در استفاده از گیاهان دارویی ارائه می دهد. بنابراین آزمون ریشه ی پیاز خوراکی یک روش کارآمد برای ارزیابی خواص سیتوتوکسیک و ژنوتوکسیک عصاره ی گیاهان دارویی می باشد. یافته

## References

- Akinboro, A. and Bakare, A., 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. Journal of Ethnopharmacology, 112(3): 470-475.
- Ansari, R. and Ekhlasi-Kazaj, K., 2012. *Adiantum capillus-veneris*. L: Phytochemical constituents, traditional uses and pharmacological properties: a review. Journal of Advance Science Research, 3(4): 15-20.
- Ashraf, M., 2002. Salt tolerance of cotton: some new advances. Critical Reviews in Plant Sciences, 21(1): 1-30.
- Ateeq, B., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2, 4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 514(1-2): 105-113.
- Bairwa, R., Sodha, R. and Rajawat, B., 2012. *Trachyspermum ammi*. Pharmacognosy Reviews, 6(11): 56-60.
- Bhattacharya, S. and Haldar, P.K., 2012. Evaluation of antimutagenic and genotoxic effects of the triterpenoid enriched extract from *Trichosanthes dioica* root. *Am-Euras. Journal of Toxicology Sciences*, 4(1): 20-23.
- Bolle, P., 2004. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. Environmental and Molecular Mutagenesis, 43(2): 137-141.
- Campos, J., 2008. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. Allelopathy Journal, 22(1): 143-152.
- Çelik, T. and Aslantürk, Ö., 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. Biologia, 62(3): 292-296.
- Çelik, T.A. and Aslantürk, Ö., 2009. Investigation of cytotoxic and genotoxic effects of *Ecballium elaterium* juice based on *Allium* test. Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 31(9): 591-592.
- Costa, M.F.B., 2014. Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. Botanical Reviews, 80(1): 1-29.
- De Souza, R.P., de Souza, C.P., Bueno, O.C. and Fontanetti, C.S., 2017. Genotoxicity evaluation of two metallic-insecticides using *Allium cepa* and *Tradescantia pallida*: a new alternative against leaf-cutting ants. Chemosphere, 168:1093–

1099.

- Dutta, J., Ahmad, A. and Singh, J., 2018. Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia*, 71(2):139-145.
- Fenech, M., 2002. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, 181: 411-416.
- Fernandes, T.C., Mazzeo, D.E.C., and Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 252-259.
- Gadano, A., 2006. Gurni A and Carballo M. Argentine folk medicine: genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2): 246-251.
- Garjani, A., 2009. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *Journal of ethnopharmacology*, 126(3): 525-532.
- Ghorbani, A., 2013. Best herbs for managing diabetes: a review of clinical studies. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(3): 413-422.
- Gömürgen, A.N., 2005. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70(2): 119-128.
- Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. *Mutation Research/ Reviews in Genetic Toxicology*, 99(3): 273-291.
- Hoodgar, F., Nasri, S. and Amin, G., 2011. Investigation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of hydro-alcoholic extract of *Securigera Securidaca* L. *Medical Sciences*, 17(1): 12-19.
- Ishaq, M.S., 2014. In vitro phytochemical, antibacterial, and antifungal activities of leaf, stem, and root extracts of *Adiantum capillus veneris*. *Science World Journal*, ID 269793: 1-8.
- Ishidate, J.M., Harnois, M. and Sofuni, T.A., 1988. comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell

- cultures. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(2): 151-213.
- Ishwar, S. and Singh, V., 2000. Antifungal properties of aqueous and organic solution extracts of seed plants against *Aspergillus flavus* and *A. niger*. *Phytomorphology*, 50(2): 151-157.
- Juchimiuk, J., Hering, B. and Maluszynska, J., 2007. Multicolour FISH in an analysis of chromosome aberrations induced by N-nitroso-N-methylurea and maleic hydrazide in barley cells. *Journal of applied genetic*, 48(2): 99-106.
- Karaismailoğlu, M.C., 2017. Assessments on the potential genotoxic effects of fipronil insecticide on *Allium cepa* somatic cells. *Caryologia*, 70(4): 378–384.
- Kumari, M., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of Total Environment*, 407(19): 5243-5246.
- Lehnen, J.R., Vaughan, M.A. and Vaughn, K.C., 1990. Terbutol affects spindle microtubule organizing centres. *Journal of Experimental Botany*, 41(5): 537-546.
- Leme, D.M. and Marin-Morales, M.A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research Reviews in Mutation Research*, 682(1): 71-81.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*, 24(4): 471-486.
- Levan, A., 1945. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. *Nature*, 156: 751-765.
- Lubini, G., 2008. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia*, 63(5): 647-651.
- Majewska, A., 2003. Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from *Rhodiola rosea* roots. *Caryologia*, 56(3): 337-351.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environment*, 25(2): 239-250.
- Pouramir, M., 2011. To study the effects of *Securigera securidaca* (L.) seed against



- alloxan-induced hyperglycemia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(14): 3188-3191.
- Prajitha, V. and Thoppil, J., 2016. Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. *South African Journal of Botany*, 102: 18-25.
- Rank, J. and Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 390(1-2): 121-127.
- Sameni, H.R., 2016. Effects of hydroalcoholic extract of *Securigera securidaca* L. seed on acute, chronic and visceral pain in male albino mice. *Koomesh*, 17(2): 288-296.
- Saulo, M.S., 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia*, 62(4): 326-333.
- Silva, D.S., 2011. Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1): 92-97.
- Sivropoulou, A., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 44(5): 1202-1205.
- Soliman, M.I., 2001. Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Journal of Biological Sciences*, 1(11): 1021-1027.
- Sultan, A.Ö. and Çelik, T.A., 2009. Genotoxic and antimutagenic effects of *Capparis spinosa* L. on the *Allium cepa* L. root tip meristem cells. *Caryologia*, 62(2): 114-123.
- Tapsell, L.C., 2006. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. *The Medical Journal of Australia*, 185(S4): S1-S24.
- Tkalec, M., 2009. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2): 76-81.
- Yavuz Kocaman, A. and Kılıç, E., 2017. Evaluation of the genotoxicity of

commercial formulations of ethephon and ethephon+cyclanilide on *Allium cepa* L. root meristematic cells. *Caryologia*, 70(3): 229–237.

Yekeen, T.A., Azeez, M.A., Lateef, A., Asafa, T.B., Oladipo, I.C., Badmus, J.A., Adejumo, S.A., Ajibola, A.A., 2017. Cytogenotoxicity potentials of cocoa pod and bean mediated green synthesized silver nanoparticles on *Allium cepa* cells. *Caryologia*, 70(4): 366–377.

Yuet Ping, K., 2012. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. *Molecules*, 17(7): 7782-7791.

## **Cytotoxicity and genotoxicity effects of some medicinal plants on root growth and root tip meristem of *Allium cepa***

Sasan Mohsenzadeh<sup>1\*</sup>, Mahsa Farrokhmanesh<sup>2</sup>

1. Associate Professor of Biology Department, Faculty of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran .  
(Corresponding author)
2. Master of Science Graduated of Biology Department, Faculty of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Received: July 2020 Accepted: October 2020 - DOI:10.22092/mpt.2020.343537.1065

### **Abstract**

Mohsenzadeh, S., Farrokhmanesh, M., Cytotoxicity and genotoxicity effects of some medicinal plants on root growth and root tip meristem of *Allium cepa*

**Iranian Medicinal Plants Technology, Vol 3, No. 1, 2020 40-61: 4-4(in Persian)**

Cytotoxic and genotoxic effects of extract and essential oil of medicinal plants are evaluated by cytogenetic experiments and parameters like mitotic index and chromosomal aberrations. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of aqueous extracts of *Securigera cecuridaca* seeds, *Adiantum capillus-veneris* leaves, and *Trachyspermum ammi* fruits on meristem cells of *Allium cepa* root and its growth was the aims of this study. Twenty gram of powdered samples were poured in to separate Erlenmeyer flask and 100 ml of distilled water were added. The flasks were covered by aluminum foil and shaken for 24 hours. Then extracts were filtered and centrifuged. In order to determine percentage of mitotic index and chromosomal aberrations 3000 cells were counted for each treatment and by division of mitotic cells and chromosomal aberrations numbers to total cells multiply to 100 were calculated. The results showed that the reduction of mitotic index and root growth of onion are related to extract concentration. The highest cytotoxicity and genotoxicity are related to aqueous extracts of *A. capillus-veneris* leaves and *S. securodaca* seeds, respectively. The extracts of three plants induced chromosomal aberrations such as C-mitosis, chromosomal stickiness, loss and laggard chromosome, chromosomal bridge, micronucleus and also cell death in the root meristematic cells of onion. The extract of *S. cecuridaca* seeds had the highest genotoxicity. Root of *Allium cepa* test is a rapid and efficient method for evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of aqueous extracts of medicinal plants. This study shows that consumption of medicinal plants must be with precaution and with standard dose.

---

Email address of the corresponding author: mohsenz@shirazu.ac.ir