University of Zanjan

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

JMPB

Original Article

Assessment of Mitotic Alterations in *Allium cepa* Root Cells under Treatment with *Catharanthus* roseus Extract

***Zeynab Kolahgar* [1], *Naser Mahna* [2], *Jaber Panahandeh Yangijeh* [3]**

1. Graduate of Horticultural Engineering Sciences, Department of Medicinal Plants, University of Tabriz.
2. Professor, Department of Horticultural Sciences and Green Space, University of Tabriz
3. Professor, Department of Horticultural Sciences and Green Space, University of Tabriz

ARTICLE INFO

Article history

Submitted: 2025-7-5
Revised: 2025-8-25
Accepted: 2025-9-8

KEYWORDS

Alkaloids.
Meristematic cells,
Mitosis,
Polyploidization

ABSTRACT

Catharanthus roseus is an important medicinal plant containing alkaloids such as vinblastine and vincristine, which have strong cell division inhibitory activity and can serve as a colchicine alternative in polyploidization programs. This study aimed to evaluate the effects of aqueous and ethanolic leaf extracts of *C. roseus* on cell division in meristematic cells of onion (*Allium cepa*) roots. Extracts at four concentrations (0, 20, 50, and 100%) were applied to onion bulbs. The experiment was conducted as a completely randomized factorial design with three replications. Traits assessed included root length and number, rooting time, mitotic and phase indices, chromosome counts, and cytological abnormalities such as multinucleation and chromatid bridges. Results showed that increasing extract concentration reduced root length, and rooting was delayed in the ethanolic extract, with the greatest delay observed at 100% concentration. The highest prophase index was recorded at 20% extract for both types, while the highest telophase index occurred at 100% ethanolic extract. Mitotic index peaked at 20% and 50% ethanolic extracts. Chromosomal abnormalities, including stickiness, breakage, and duplication, were mainly observed in 50% ethanolic extract, whereas chromatid bridges appeared only in 50% aqueous extract. These findings indicate that C. roseus alkaloids can influence mitosis and may be applied in breeding programs and polyploidization of medicinal plants.

* Corresponding author: ***Zeynab Kolahgar***

✉ E-mail: *zeynab.kolahgar1@gmail.com*

مجله زیست فناوری گیاهان دارویی
JMPB

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات میتوزی در سلول‌های ریشه پیاز تحت تیمار با عصاره‌ی گیاه پروانش

زینب کلاهگر*[1]، ناصر مهنا [2]، جابر پناهنده ینگیجه [3]

۱.دانش‌آموخته علوم مهندسی باغبانی گرایش گیاهان دارویی دانشگاه تبریز.
۲.استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز،
۳.استاد گروه علوم باغبانی دانشگاه تبریز.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۷-۲-۱۴۰۴
بازنگری: ۳-۶-۱۴۰۴
پذیرش: ۱۷-۶-۱۴۰۴

چکیده: پروانش (*Catharanthus roseus*) یکی از گیاهان دارویی مهم است که به دلیل دارا بودن آلکالوئیدهایی مانند وین‌بلاستین و وین‌کریستین، توانایی بالایی در مهار تقسیم سلولی دارد و می‌تواند به‌عنوان جایگزین کلشی‌سین در برنامه‌های پلی‌پلوئیدی‌سازی استفاده شود. هدف این پژوهش بررسی تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ پروانش بر تقسیم سلولی در سلول‌های مریستمی ریشه پیاز (*Allium cepa*) بود. عصاره‌ها در چهار غلظت (۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰درصد) تهیه و به پیاز اعمال شدند. آزمایش به صورت کاملاً تصادفی و فاکتوریل با سه تکرار انجام شد. صفات مورد بررسی شامل طول و تعداد ریشه، زمان ریشه‌زایی، شاخص میتوز، شاخص‌های فازی، تعداد کروموزوم‌ها و ناهنجاری‌های سیتولوژیکی نظیر چندهسته‌ای شدن و پل‌کروماتیدی بود. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، طول ریشه کاهش یافت و ریشه‌زایی در عصاره اتانولی کندتر شد، به‌طوری که بیش‌ترین تأخیر در غلظت ۱۰۰درصد مشاهده گردید. بیش‌ترین شاخص پروفاز در ۲۰درصد عصاره هر دو نوع و بیش‌ترین شاخص تلوفاز در ۱۰۰درصد عصاره اتانولی ثبت شد. شاخص میتوز در ۲۰ و ۵۰ درصد عصاره اتانولی به بالاترین میزان رسید. ناهنجاری‌های کروموزومی شامل چسبندگی، شکستگی و مضاعف‌شدگی عمدتاً در ۵۰ درصد عصاره اتانولی مشاهده شد، در حالی که پل کروماتیدی فقط در ۵۰ درصد عصاره آبی ثبت گردید. این یافته‌ها نشان می‌دهد که آلکالوئیدهای پروانش می‌توانند با تأثیر بر میتوز در برنامه‌های به‌نژادی و پلی‌پلوئیدی‌سازی گیاهان دارویی کاربرد داشته باشند.

واژگان کلیدی:
آلکالوئید، پلی‌پلوئیدی‌سازی، تقسیم میتوز، سلول‌های مریستمی

*نویسنده مسئول: **زینب کلاهگر**
✉ E-mail: zeynab.kolahgar1@gmail.com

Journal homepage: ***jmpb.znu.ac.ir***

مقدمه

گیاه دارویی‌پروانش(*Catharanthus roseus*)، یکی از منابع اصلی آلکالوئیدهای ایندول مانند وین‌بلاستین و وین‌کریستین است که کاربردهای درمانی بسیاری در زمینه سرطان دارد (Jacobs et al. 2004). این آلکالوئیدها با مهار میتوز و توقف تقسیم سلولی، به‌ویژه در سلول‌های سرطانی، اثرات درمانی خود را نشان می‌دهند (Dhyani et al. 2022). به‌دلیل اهمیت بالای این متابولیت‌های ثانویه در صنعت داروسازی، افزایش تولید آن‌ها در گیاهان دارویی امری ضروری است. پلی‌پلوئیدی‌سازی در گیاهان به‌طور عمده با استفاده از مواد آنتی‌میتوتیک مانند کلشی‌سین انجام می‌شود. این مواد با تأثیر بر میکروتوبول‌ها، فرآیند میتوز را مهارکرده و منجر به ایجاد پلی‌پلوئیدهای خود به خودی می‌شوند (Desmet et al. 2019). درحالی‌که کلشی‌سین به‌طور گسترده‌ای در تحقیقات پلی‌پلوئیدی استفاده شده است، نگرانی‌هایی در مورد سمیت آن برای گیاهان وجود دارد. به‌همین‌دلیل، محققان به‌دنبال منابع طبیعی برای جایگزینی این ماده شیمیایی هستند. دراین‌راستا، استفاده از آلکالوئیدهای گیاهان دارویی همچون پروانش برای القای پلی‌پلوئیدی به‌عنوان یک راه‌حل نوین مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات نشان داده، عصاره‌ی آبی برگ گیاه *Clerodendrum inerme* باعث ایجاد ورم در نوک ریشه و بروز متافازهای مشابه کلشی‌سین و سایر ناهنجاری‌های میتوزی در سلول‌های مریستمی پیاز شده است (Barman et al; 2022). پژوهش‌ها نشان‌داده‌اند که آلکالوئیدهای وین‌کریستین و وین‌بلایستین با مهار تشکیل دوک میتوزی و پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها، موجب توقف تقسیم سلولی و افزایش سطح پلوئیدی شوند (Billa et al. 2022; Mohammed, 2016). در پژوهش‌های دیگر، عصاره پروانش برای القای پلی‌پلوئید در گیاهان مختلف مانند بادام‌زمینی (Rohma et al. 2021) و گل سوسن (Slamet et al. 2019) استفاده شده است و نتایج مثبتی در افزایش تعداد کروموزوم‌ها و بهبود ویژگی‌های فنوتیپی گیاهان به‌دست آمده است. ریشه پیاز یکی از مدل‌های استاندارد و پرکاربرد برای بررسی مراحل میتوز در گیاهان است. این مدل به‌دلیل رشد سریع، شفافیت سلول‌ها، سهولت تهیه، هزینه کم و ویژگی‌های کروموزومی مناسب، به‌طور گسترده‌ای در مطالعات سمیت سلولی و ژنتیکی به‌کار می‌رود. قابلیت بالای سلول‌های مریستمی پیاز برای نشان‌دادن اثرات مواد شیمیایی و گیاهی بر تقسیم سلولی، آن را به ابزاری مفید در ارزیابی اختلالات میتوزی و آنیوپلوئیدی تبدیل کرده است (Fiskesjö, 1985). در تحقیق

حاضر، تأثیر عصاره‌های آبی و اتانولی برگ‌های گیاه پروانش بر تقسیم سلولی در ریشه‌های گیاه پیاز خوراکی (*Allium cepa*) بررسی شده است. هدف این مطالعه، ارزیابی اثر آلکالوئیدهای موجود در این عصاره‌ها در توقف میتوز و استفاده از آن‌ها به‌عنوان جایگزین برای کلشی‌سین در فرآیندهای پلی‌پلوئیدی‌سازی است. نتایج این تحقیق می‌تواند به گسترش استفاده از عصاره‌های گیاهی در علوم زیستی و کشاورزی کمک کند.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۴۰۲ در آزمایشگاه بیولوژی گلدهی و فیزیولوژی رشد و نمو میوه، گروه علوم باغبانی، واقع در مرکز تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد. پیازهای قرمز کوچک از منطقه ایلخچی (شهرستان تبریز) خریداری و در یخچال نگهداری شدند تا آماده استفاده شوند. هم‌چنین، ۱۵ گلدان حاوی گیاه پروانش از گلخانه‌ای در مسیر تبریز-آذرشهر تهیه و تحت شرایط کنترل شده گلخانه‌ای (دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس و رطوبت ۶۰٪) نگهداری شدند. عصاره‌گیری از برگ گیاه پروانش برای تهیه عصاره آبی و اتانولی از نمونه‌های برگی گیاه پروانش در مرحله زایشی استفاده شد. در این مرحله از برگ های این گیاه، ۱۰ گرم برگ خشک شده با استفاده از نیتروژن مایع پودر شده و با ۹۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از آن، عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ *rpm* جدا شد. بخش فوقانی محلول سانتریفیوژ شده با استفاده از دستگاه روتاری (Rotary ika rv 10 Water bath hb 10) به‌طور جزئی تغلیظ شد (از ۱۰۰ میلی‌لیتر به حدود ۵۰ میلی‌لیتر). سپس عصاره از طریق فیلتر کاغذی واتمن شماره ۴۲ صاف و جمع‌آوری شد. برای تهیه عصاره آبی، از روش دِکُکسیون با اصلاحات جزئی استفاده شد. مقدار ۱۰ گرم پودر برگ خشک‌شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در بالن ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد (Ravindra et al. 2019). این مخلوط در حمام آب گرم در دمای ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و در طول مدت عصاره‌گیری چندین بار هم زده شد تا استخراج ترکیبات مؤثر بهینه شود. پس از خنک‌شدن تا دمای اتاق، عصاره ابتدا از پارچه استریل دو لایه عبور داده شد و سپس از صافی کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد. برای حذف ذرات معلق باقی‌مانده، عصاره به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی به‌عنوان عصاره آبی جمع‌آوری شده و یا به‌صورت تازه مصرف شد، یا در دمای

منفی ۲۰ درجه سانتی گراد برای استفاده‌های بعدی ذخیره گردید. رقت‌های مختلف عصاره با درصدهای ۰٪ (آب مقطر)، ۲۰٪ (۲ میلی‌لیتر عصاره + ۸ میلی‌لیتر آب مقطر)، ۵۰٪ (۵ میلی‌لیتر عصاره + ۵ میلی‌لیتر آب مقطر) و ۱۰۰٪ (عصاره خالص) با استفاده از سمپلر تهیه گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل (فاکتور اول نوع عصاره و فاکتور دوم غلظت عصاره بود) در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و تعداد ۵ نمونه در تکرار انجام شد.

تیمار ریشه‌های پیاز با عصاره‌ها پیازهای قرمز درون ظروفی حاوی عصاره‌ها قرار داده شده و در محیطی تاریک و خنک (با دمای ۱۸ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. به‌منظور افزایش تمرکز گیاه بر فرآیند ریشه‌زایی، ساقه‌های پیازها با قیچی استریل قطع شدند. اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی برای اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی، ابتدا پیازها از محیط مایع خارج شده و با آب مقطر شسته شدند. سپس، طول ریشه‌های تشکیل‌شده با استفاده از خط‌کش و به واحد میلی‌متر اندازه‌گیری گردید. تعداد ریشه‌های شکل‌گرفته نیز به‌طور دستی شمارش شد. به‌منظور محاسبه تعداد روز تا ریشه‌زایی، از روز صفر (زمان قرارگیری پیازها در داخل عصاره‌ها) تا مشاهده اولین ریشه، مدت زمان مورد نیاز ثبت شد. آماده‌سازی نمونه‌ها برای مطالعات سیتوژنتیکی جهت مطالعه سیتوژنتیکی در سلول‌های در حال تقسیم ابتدا نوک ریشه‌ها به‌وسیله قیچی و پنس استریل از گیاهچه جدا و در محلول آلفابرومونفتالین یک درصد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳ درجه نگهداری شدند سپس بعد گذشتن زمان مدنظر ریشه‌ها از محلول خارج با اب مقطر شستشو داده شد. پس از جداسازی نوک ریشه‌ها، نمونه‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در محلول تثبیت‌کننده (اتانول ۹۶ درصد و استیک اسید گلاسیال با نسبت ۳:۱) قرار گرفتند. پس از تثبیت، ریشه‌ها با آب مقطر شسته‌شده و سپس در محلول HCl یک نرمال در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه هیدرولیز شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی (استو اورسئین) قرار گرفتند. تهیه کاریوتیپ و مشاهده میکروسکوپی نمونه‌های تثبیت‌شده پس از شستشو در اسید کلریدریک یک نرمال در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه هیدرولیز شدند. سپس نمونه‌های هیدرولیزشده به مدت ۲۴ ساعت در استو اورسئین رنگ‌آمیزی شدند. پس از برش دادن نوک ریشه‌ها، یک قطره اسید استیک ۴۵٪ اضافه شده و لامل پوششی قرار داده شد. با استفاده از ضربات کنترل‌شده و کاغذ صافی، رنگ‌های اضافی خارج و سلول‌ها به‌طور یکنواخت پخش شدند تا برای بررسی میکروسکوپی آماده شوند. اسلایدها با میکروسکوپ نوری مدل Nikon Eclipse E400 در

بزرگ‌نمایی‌های ×۱۰، ×۲۰، ×۴۰ و ×۱۰۰ بررسی گردیدند. برای ارزیابی شاخص فازی، از رابطه‌ای استفاده شد که در آن تعداد سلول‌های درگیر در هر یک از مراحل تقسیم (پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز) بر تعداد کل سلول‌های در حال تقسیم تقسیم شد (رابطه ۲-۱)؛ این شاخص به بررسی توزیع سلول‌ها در مراحل مختلف تقسیم میتوز کمک می‌کند. هم‌چنین، برای محاسبه شاخص متوسط میتوزی از رابطه ۱-۳ استفاده شد که نسبت مجموع سلول‌های در حال تقسیم به کل سلول‌های شمارش‌شده را نشان می‌دهد. این شاخص‌ها به‌منظور بررسی اثر تیمارها بر فعالیت تقسیم سلولی به کار رفتند (Fiskesjö, 1985). برای شمارش تعداد کروموزوم‌ها، پس از تهیه کاریوتیپ، با استفاده از میکروسکوپ نوری شمارش شدند. هم‌چنین، به‌منظور ارزیابی ناهنجاری‌های میتوزی، حضور ریزهسته‌ها (Micronuclei) و پل‌های کروماتیدی در سلول‌ها مورد بررسی و ثبت قرار گرفت.

رابطه ۲-۱

$$\text{شاخص فازی} = \frac{\text{تعداد سلول‌ها در هر مرحله فازی}}{\text{تعداد سلول‌های در حال تقسیم (پروفاز، متافاز، آنافاز، تلوفاز)}}$$

رابطه ۳-۱

$$\text{شاخص متوسط میتوزی} = \frac{\text{تعداد سلول‌های در حال تقسیم (پروفاز، متافاز، آنافاز، تلوفاز)}}{\text{تعداد کل سلول‌های شمارش شده}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار *SAS* نسخه۹/۱ انجام گرفت. برای نرمال-سازی داده‌ها و هم‌چنین برای مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) از نرم افزار *SPSS* استفاده شد و نمودارها با نرم افزار *Excel* رسم شدند

نتایج

نتایج جدول تجزیه واریانس (۱) داده-های مربوط به تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره آبی و اتانولی بر میزان طول ریشه، تعداد ریشه و تعداد روز تا ریشه‌زایی پیاز نشان داد که اثر متقابل این تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر میزان طول ریشه معنی‌دار است. اثرات

متقابل نوع عصاره و غلظت عصاره بر تعداد ریشه و تعداد روز تا ریشه‌زایی تاثیری نداشت. در صفت تعداد ریشه اثرات نوع عصاره و غلظت عصاره تاثیر معنی‌داری روی این صفت نداشت ولی اثرات اصلی این تیمارها به تنهایی بر تعداد روز تا ریشه‌زایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود.

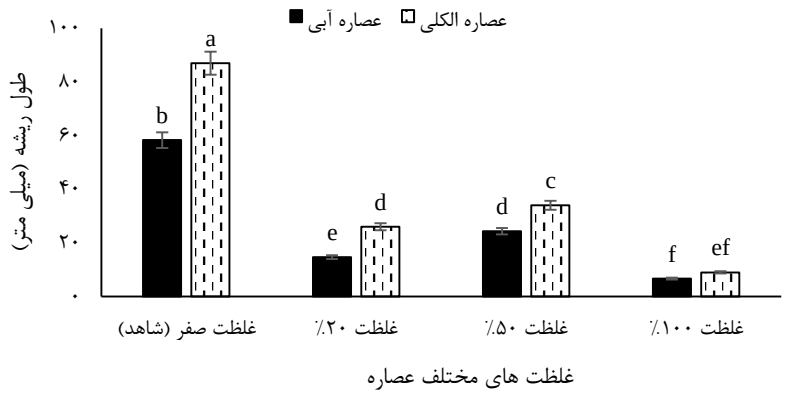
جدول ۱- تجزیه واریانس تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر روی صفات طول ریشه، تعداد ریشه و تعداد روز تا ریشه‌زایی در پیاز

		میانگین مربعات		
منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه	تعداد ریشه	تعداد روز تا ریشه‌زایی
نوع عصاره (A)	۱	۹۹۱/۴۱۱**	۴۲/۰۹۳^{ns}	۵۰/۸۲۳*
غلظت (B)	۳	۴۱۲۸/۰۵۲**	۵/۱۸۶^{ns}	۳۸/۰۵۲*
A×B	۳	۱۵۱/۲۴۵**	۵/۳۱۲^{ns}	۶/۰۵۲^{ns}
خطا	۱۶	۱۵/۲۴۴	۱۴/۸۳	۱۰/۱۳۳
ضریب تغییرات (Cv)	درصد	۱۳/۰۱	۸۲/۷۸	۴۹/۸

*و**و ^{ns}به‌ترتیب نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین مربعات است.

طول ریشه پیاز خوراکی

مقایسه میانگین داده‌ها (نمودار ۱) نشان داد با افزایش غلظت عصاره در هر دو نوع عصاره آبی و اتانولی نسبت به تیمار شاهد، باعث کاهش طول ریشه می‌شود. بیش‌ترین میزان طول ریشه (۸۷ میلی‌متر) در غلظت ۰درصد (شاهد) حاصل شد و کم‌ترین این صفت مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد در هر دو نوع عصاره آبی (۶ میلی‌متر) و اتانولی (۶ میلی‌متر) بود.



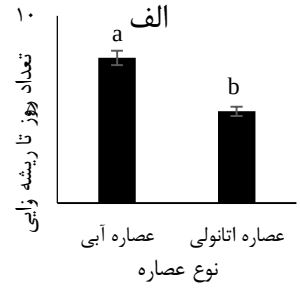
نمودار ۱- مقایسه میانگین تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر طول ریشه پیاز. علامت بار نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

تعداد ریشه پیاز خوراکی

بررسی این صفت نشان داد که اثرات نوع عصاره و غلظت عصاره و هم‌چنین اثرات متقابل نوع عصاره و غلظت عصاره بر روی این صفت معنی‌دار نشد.

تعداد روز تا ریشه پیاز خوراکی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد اثر تیمار نوع عصاره (نمودار ۲ الف) تاثیر معنی‌داری بر روی ریشه‌زایی پیاز دارد. نتایج نشان داد استفاده از عصاره اتانولی باعث می‌شود ریشه‌زایی کندتر اتفاق بیافتد. هم‌چنین اثر غلظت عصاره (نمودار ۲ ب) نشان داد با افزایش غلظت عصاره ریشه‌زایی کندتر اتفاق افتاد و در غلظت ۱۰۰درصد کندترین ریشه‌زایی صورت گرفت.



نمودار ۲- مقایسه میانگین الف) تاثیر نوع روش عصاره گیری و ب) غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر تعداد روز تا ریشه‌زایی پیاز. علامت بار نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

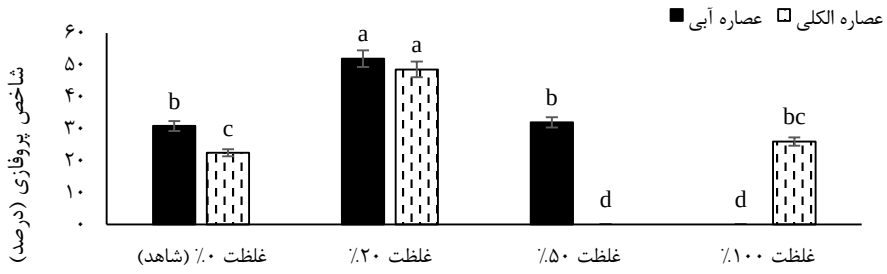
نتایج جدول تجزیه واریانس (۲) تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز مریستم نوک ریشه در پیاز نشان داد که اثر متقابل این تیمارها در سطح احتمال یک درصد بر درصد شاخص فازی پروفاز، آنافاز، تلوفاز و هم‌چین شاخص تقسیم میتوزی معنی‌دار است اما اثرات اصلی و متقابل تیمارها تاثیر معنی‌داری بر تعداد درصد شاخش فازی متافاز معنی‌دار نبود.

جدول ۲- تجزیه واریانس تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز مریستم نوک ریشه در پیاز

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد شاخص فازی پروفاز	میانگین مربعات درصد شاخص متافاز	درصد شاخص آنافاز	درصد شاخص تلوفاز	شاخص تقسیم میتوزی
نوع عصاره (A)	۱	۱۱۳/۱۴۳**	۴۲/۰۹۴^{ns}	۱/۶۲۱^{ns}	۸/۰^{ns}	۲۸/۶۵۲**
غلظت (B)	۳	۱۷۱۸/۱۲۶**	۴۱/۸۹۳^{ns}	۳۶۸/۵۰۷**	۳۸/۱^{ns}	۲۰/۳۷۹**
A×B	۳	۸۵۲/۸۹**	۴۱/۸۳۴^{ns}	۳۷۲/۳۶۵**	۴۰۶/۹۱۴**	۲۹/۵۸۱**
خطا	۱۶	۱۲/۲۳۱	۸/۱۳۳	۲۹/۵۴۵	۲۵/۸۷۲	۳/۱۸۵
ضریب تغییرات (Cv)	درصد	۸۹/۹۶	۳۶/۷۸	۳۳/۲۰	۴۵/۸۷	۴۰/۹۶

درصد شاخص فازی پروفاز

مقایسه میانگین (نمودار ۳) تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی پروفاز تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز نشان داد تیمار غلظت ۲۰درصد عصاره آبی و اتانولی بیش‌ترین (۵۲درصد) تاثیر را بر شاخص فازی پروفازی دارند. هم‌چنین کم‌ترین (صفر درصد) مقدار این شاخص مربوط به تیمار ۵۰درصد عصاره اتانولی و ۱۰۰ درصد عصاره آبی بود.



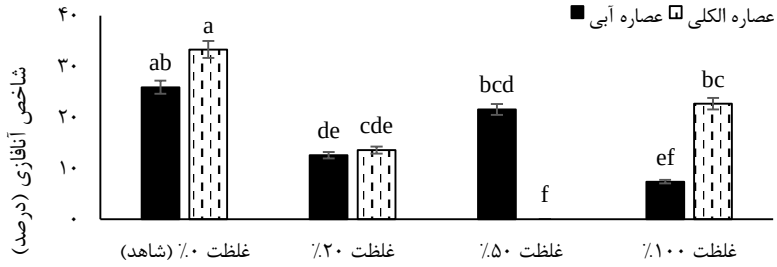
نمودار ۳- مقایسه میانگین تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی پروفاز تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز . علامت بار نشان دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

درصد شاخص فازی متافاز

در بررسی این صفت مشاهده شد که اثرات نوع عصاره و غلظت عصاره تاثیر معنی-داری بر روی این صفت ندارد. هم‌چنین اثرات متقابل این تیمارها نیز معنی‌دار نشد.

درصد شاخص فازی آنافاز

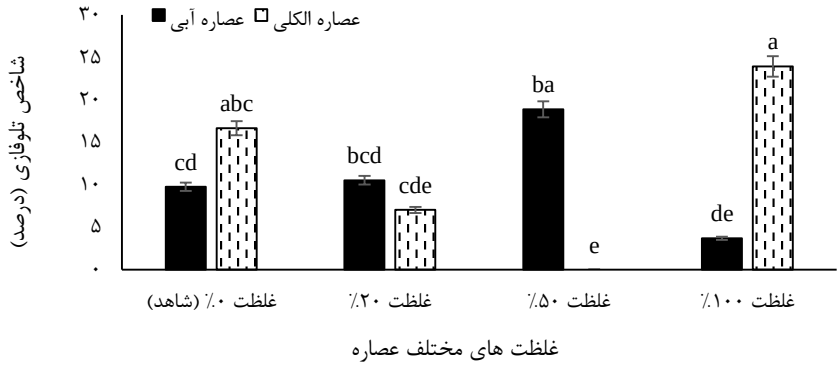
مقایسه میانگین (نمودار ۴) تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی آنافاز تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز نشان داد تیمار شاهد بیش‌ترین (۲۵درصد) تاثیر را بر شاخص فازی پروفازی دارند. هم‌چنین کم‌ترین (صفر درصد) مقدار این شاخص مربوط به تیمار ۵۰درصد عصاره اتانولی بود.



نمودار ۴- مقایسه میانگین تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی آنافاز تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز . علامت بار نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

درصد شاخص فازی تلوفازی

مقایسه میانگین (نمودار ۵) تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی تلوفازی تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز نشان داد تیمار غلظت ۱۰۰درصد عصاره اتانولی بیش‌ترین (۲۳درصد) تاثیر را بر شاخص فازی تلوفازی دارند. هم‌چنین کم‌ترین (صفر درصد) مقدار این شاخص مربوط به تیمار ۰/۵درصد عصاره اتانولی بود.

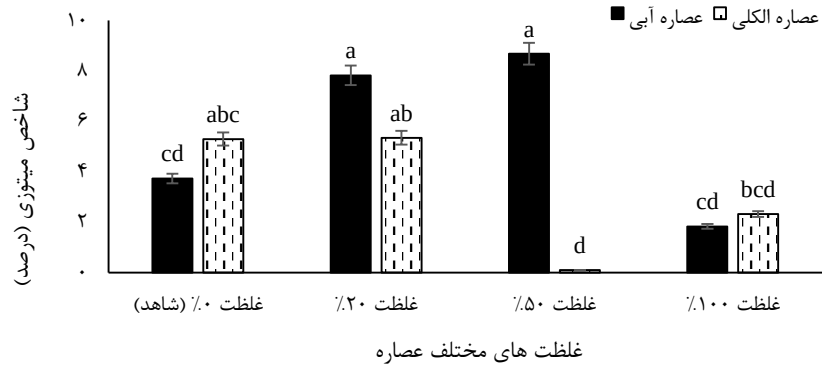


نمودار ۵- مقایسه میانگین تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص فازی تلوفاز تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز .علامت بار نشان‌دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

همان‌طورکه در نمودار ۵ مشاهده می‌کند غلظت ۵۰درصد عصاره اتانولی دارای کم‌ترین درصد شاخص فازی تلوفاز است. عصاره پرواش که آلکالوئیدهای وین‌بلاتسین و وینکستین بخش اصل آن را تشکیل می-دهد با ممانعت از تشکیل و پایداری دوک‌های میتوتیک، سلول‌ها را از ورود به تلوفاز بازمی‌دارند و باعث کاهش شاخص تلوفازی می‌شوند.

شاخص تقسیم میتوز

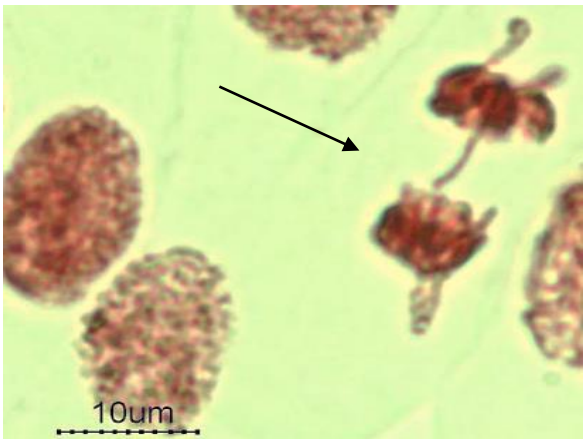
مقایسه میانگین (نمودار ۶) تاثیر نوع روش عصاره‌گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر شاخص تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز نشان داد تیمار غلظت ۲۰درصد و ۵۰درصد عصاره اتانولی بیش‌ترین (۸ و ۷درصد) تاثیر را بر شاخص تقسیم میتوز داشت. هم‌چنین کم‌ترین (۰/۱ درصد) مقدار این شاخص مربوط به تیمار ۵۰درصد عصاره اتانولی بود.



نمودار ۶- مقایسه میانگین تاثیر نوع روش عصاره گیری و غلظت‌های مختلف عصاره گیاه پروانش بر درصد شاخص تقسیم میتوز در مریستم نوک ریشه پیاز علامت بار نشان دهنده انحراف معیار داده‌ها است. حروف مشابه روی ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

پل کروماتیدی

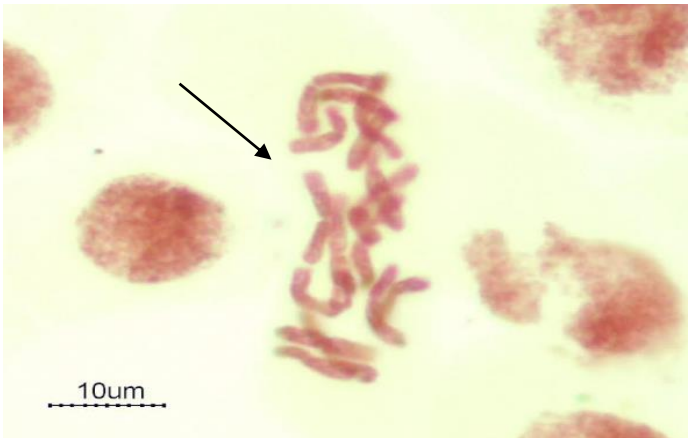
در بررسی‌های انجام شده فقط یک مورد پل کروماتیدی مشاهده شد (شکل ۱) که مربوط به تیمار ۵۰درصد عصاره آبی بود در بقیه موارد، پل کروماتیدی مشاهده نشد.



شکل ۱- پل‌کروماتیدی مشاهده‌شده. فلش نشان‌دهنده پل می‌باشد.

شمارش کروموزومی

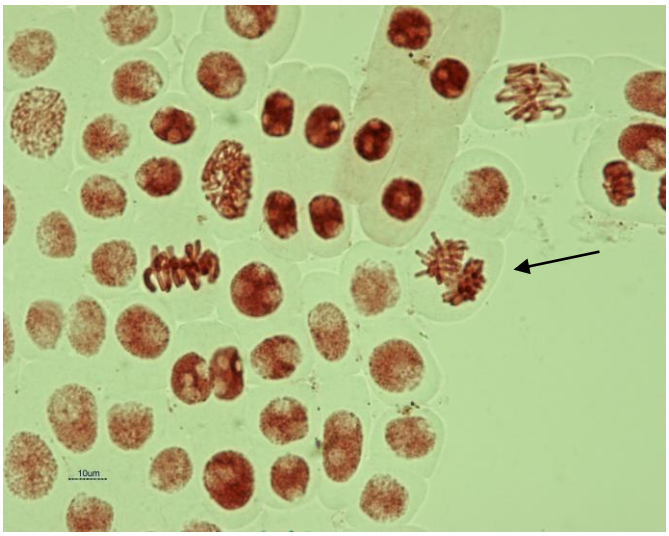
در شمارش تعداد کروموزوم سلول‌های مریستم نوک ریشه پیاز تعداد ۱۶ کروموزوم مشاهده شد که در تصویر ۲ قابل مشاهده است.



شکل ۲- تعداد کروموزوم‌های شمارش شده. فلش نشان دهنده کروموزوم‌های مشاهده شده است.

مضاعف شدگی کروموزوم

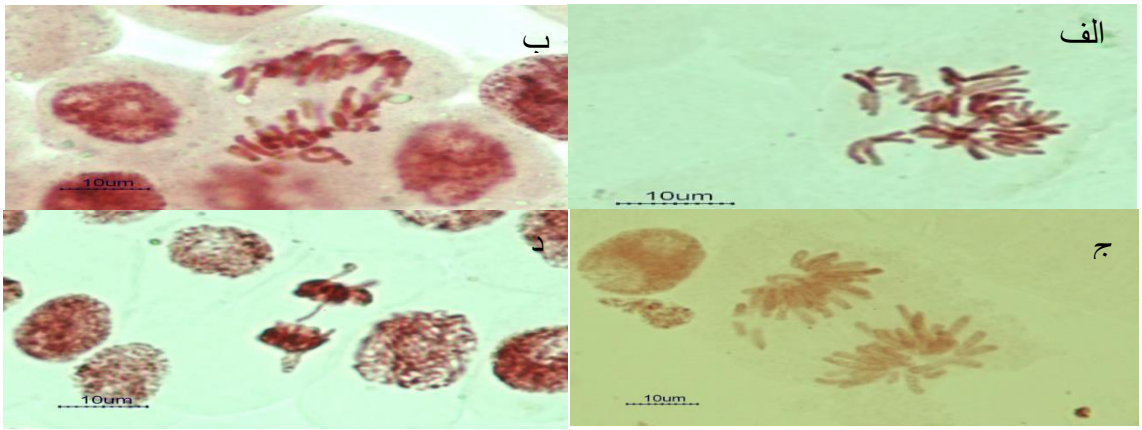
تعداد معدودی از سلول‌ها دارای مضاعف‌شدگی کروموزوم بودند که بیشتر آن‌ها در تیمار غلظت ۵۰درصد عصاره اتانولی مشاهده شد. در تصویر سلول‌ها دارای مضاعف‌شدگی کروموزوم قابل مشاهده است (شکل ۳).



شکل ۳-سلول‌ها دارای مضاعف‌شدگی کروموزوم. فلش‌ها نشان دهنده مضاعف‌شدگی کروموزوم می باشد.

جداشدگی کروموزوم

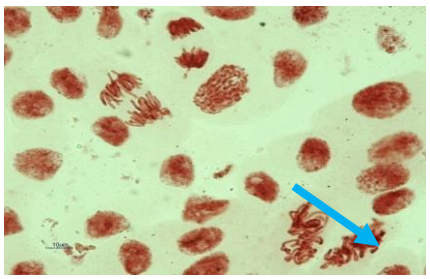
تعدادی از سلول‌ها دارای جداشدگی کروموزوم بودند که بیشتر آن‌ها در تیمار غلظت ۵۰درصد عصاره اتانولی مشاهده شد. در تصویر سلول‌ها دارای جداشدگی کروموزوم قابل مشاهده است (شکل۴).



شکل ۴- الف و ب) سلول‌ها دارای جداشدگی کروموزوم در مرحله متافاز. ج) سلول‌ها دارای جداشدگی کروموزوم در مرحله آنافاز و د) سلول‌ها دارای جداشدگی کروموزوم در مرحله تلوفاز.

چسبندگی کروموزوم

تعدادی از سلول‌ها دارای چسبندگی کروموزوم بودند که بیشتر آن‌ها در تیمار غلظت ۵۰درصد عصاره اتانولی مشاهده شد. در تصویر سلول‌ها دارای چسبندگی کروموزوم قابل مشاهده است (شکل ۵).



شکل۵- سلول‌ها دارای چسبندگی کروموزوم در مرحله متافاز. فلش‌ها نشان دهنده چسبندگی کروموزوم می باشد.

بحث

در پژوهش حاضر، زمانی‌که از عصاره اتانولی استفاده شد، نسبت به عصاره آبی، در تمامی غلظت‌ها طول ریشه بیشتری مشاهده گردید. به نظر می‌رسد که افزایش غلظت عصاره‌ها، تأثیر مهاری بیشتری بر فرآیند ریشه‌زایی در پیاز داشته است. این احتمال وجود دارد که با افزایش غلظت عصاره‌ها، اثرات مهاری آن‌ها بر رشد ریشه بیشتر شود. تفاوت‌های مشاهده شده بین عصاره اتانولی و آبی ممکن است به ترکیبات شیمیایی مختلف موجود در هر یک از این عصاره‌ها مربوط باشد. به‌ویژه، عصاره اتانولی به‌دلیل توانایی بالاتر در استخراج ترکیبات شیمیایی، تأثیرات متفاوت‌تری نسبت به عصاره آبی دارد. ترکیبات محلول در اتانول، ازجمله آلکالوئیدها، تانن‌ها و سایر متابولیت‌های ثانویه، ممکن است به‌عنوان بازدارنده‌های رشد عمل کنند. تحقیقات قبلی نیز نشان داده‌اند که عصاره‌های اتانولی نسبت به عصاره‌های آبی اثرات بیولوژیکی قوی‌تری دارند (Plascencia-Villa and Perry, 2020). در بررسی تعداد روز تا ریشه‌زایی مشاهده شد که با افزایش غلظت عصاره‌ها رشد ریشه کندتر (تعداد روز تا ریشه‌زایی افزایش یافت) شد و عصاره اتانولی بیش‌ترین کاهش رشد را نسبت عصاره آبی داشت که این نشان می‌دهد، احتمالا عصاره اتانولی گیاه پروانش توانسته تقسیم میتوز را کندتر کند. از سوی دیگر، عصاره آبی باعث کاهش تعداد روزها تا ریشه‌زایی شد که نشان‌دهنده تسریع این فرآیند در مقایسه با عصاره اتانولی است. این امر می‌تواند به ترکیبات مؤثری چون ویتامین‌ها یا هورمون‌ها در عصاره آبی مربوط باشد که موجب تسریع در ریشه‌زایی می‌شوند (Peixoto et al., 2011). در بررسی شاخص فازی پروفاز، مشاهده شد که افزایش این شاخص در غلظت ۲۰ درصد عصاره، ممکن است به‌دلیل توقف سلول‌ها در مرحله پروفاز باشد، که از ویژگی‌های آلکالوئیدها ازجمله کلشی‌سین است (Yanagida, 2014). در مقابل، کاهش شاخص آنافازی به‌علت تأثیر آلکالوئیدهای موجود در عصاره‌ها بر میکروتوبول‌ها و اختلال در تشکیل دوک‌های میتوزی است (Saulo et al., 2009). نتایج پژوهش نشان می‌دهد که این ترکیبات می‌توانند باعث توقف سلول‌ها در مراحل اولیه میتوز و کاهش درصد سلول‌هایی شوند که قادر به ورود به مرحله آنافاز هستند. هم‌چنین کاهش شاخص میتوزی در نتایج این تحقیق می‌تواند به اختلالات ایجاد شده توسط عصاره گیاه پروانش در چرخه سلولی و میتوز اشاره داشته باشد. در غلظت‌های پایین‌تر عصاره آبی (۲۰ و ۵۰ درصد)، افزایش شاخص میتوزی مشاهده شد که احتمالاً به دلیل افزایش تقسیم سلولی است. مشابه همین نتایج در تحقیقات قبلی نیز مشاهده شده

است، جایی که اثرات ضد میتوزی عصاره‌های گیاهی بر رشد ریشه و شاخص میتوزی بررسی شده است (Bhattacharya and Haldar, 2012). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره‌های گیاه دارویی پروانش، به‌ویژه در غلظت ۵۰ درصد عصاره اتانولی، موجب بروز اختلالات قابل‌توجهی در مراحل مختلف تقسیم میتوز در سلول‌های مریستمی ریشه پیاز شدند. ازجمله این اختلالات می‌توان به پدیده‌های کروماتیدی نظیر پل کروماتیدی، چسبندگی، شکستگی و جداشدگی کروموزومی اشاره کرد. مشاهده یک مورد پل کروماتیدی تنها در تیمار ۵۰ درصد عصاره آبی نشان‌دهنده اثر محدود این عصاره بر این نوع اختلال خاص است. پل کروماتیدی معمولاً ناشی از شکست ناقص کروماتیدهای خواهری یا جدایش ناقص کروموزوم‌هاست که ممکن است به دلیل اثر آلکالوئیدهای موجود در عصاره روی ساختار دوک تقسیم رخ دهد (Fenech, 2000). شمارش کروموزوم‌ها در سلول‌های تیمار شده عدد ثابت ۱۶ را نشان داد که با کروموزوم‌های دیپلوئیدی پیاز هم‌خوانی دارد (Smith, 2013). با این حال، مشاهده ناهنجاری‌هایی مانند مضاعف‌شدگی و چسبندگی کروموزوم‌ها بیانگر آن است که عصاره پروانش قادر به تأثیر بر ساختار و رفتار کروموزوم‌ها در طی میتوز می‌باشد. این ویژگی می‌تواند آن را به‌عنوان جایگزینی مناسب برای کلشی‌سین در فرآیند پلی‌پلوئیدی‌سازی معرفی نماید (Levan, 1938). در نهایت، نتایج پژوهش حاضر با مطالعات پیشین هم‌راستا بوده و نشان‌دهنده‌ی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های گیاهی و اختلالات آن‌ها در مراحل مختلف میتوز می‌باشد، که این موضوع می‌تواند در آینده به‌عنوان مبنای تحقیقات بیشتر در زمینه اثرات گیاهان دارویی بر تقسیم سلولی و میتوز در گیاهان مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که عصاره‌های آبی و اتانولی گیاه پروانش موجب کاهش رشد ریشه و شاخص میتوزی در سلول‌های مریستمی پیاز شدند. عصاره آبی با تسریع در ریشه‌زایی و عصاره اتانولی با کاهش مراحل خاصی از میتوز، به‌ویژه آنافاز، اثرات متفاوتی بر روند تقسیم سلولی داشتند. این تفاوت احتمالاً ناشی از نوع ترکیبات مؤثر موجود در هر عصاره است. در مجموع، پروانش دارای پتانسیل فیتوتوکسیستی و ضدمیتوزی قابل‌توجهی است که می‌تواند در مطالعات سلولی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Barman, S., Bhattacharjee, A., Paul, S., & Ray, S. (2022). Aqueous leaf extract of *Clerodendrum inerme* (L.) Gaertn. induces root tip swelling and colchicine-like c-metaphase and

monitoring. Hereditas, 102(1), 99-112.
- Jacobs, D. I., Snoeijer, W., Hallard, D., & Verpoorte, R. (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry, 11(5), 607-628.
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. Hereditas, 24(4), 471–486
- Mohammed, I. H. (2016). A vinca alkaloid effect on microtubules of CHO (China Hamster Ovary). American Journal of Biomed. Sci., 4(6), 227-235.
- Peixoto, J. R. O., Silva, G. C., Costa, R. A., Vieira, G. H. F., Fonteles Filho, A. A., & dos Fernandes Vieira, R. H. S. (2011). In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4(3), 201-204.
- Plascencia-Villa, G., & Perry, G. (2020). Status and future directions of clinical trials in Alzheimer's disease. International Review of Neurobiology, 154, 3-50.
- Ravindra, P., Meena, A. K., & Pasha, S. (2019). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Catharanthus roseus* leaf extract. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8(1), 201–204.
- Rohmah, D. I., Mulyani, M., Janah, L. N., Pancoro, A., Miftahudin, M., Wibowo, A. T., & Daryono, B. S. (2022, May). The other mitotic abnormalities in *Allium cepa* L. Cytologia, 87(2), 163–170.
- Bhattacharya, S., & Haldar, P. K. (2012). Evaluation of antimitotic and genotoxic effects of the triterpenoid enriched extract from *Trichosanthes dioica* root. Am-Eurasian Journal of Toxicological Sciences, 4(1), 20-23.
- Billa, A. T., Lestari, S. S., Daryono, B. S., & Subiastuti, A. S. (2022). Bio-catharantin effects on phenotypic traits and chromosome number of shallots (*Allium cepa* L. var. Ascalonicum 'Tajuk').
- Desmet, S., Dhooghe, E., Sabbaghi, H. R., Denaeghel, H., De Keyser, E., Van Huylenbroeck, J., & Geelen, D. (2019, September). Breeding for compact growth using rhizogenic agrobacteria: evaluation of a technique for woody ornamentals. In XXVI International Eucarpia Symposium Section Ornamentals: Editing Novelty 1283 (pp. 9-16).
- Dhyani, P., Quispe, C., Sharma, E., Bahukhandi, A., Sati, P., Attri, D. C., ... & Cho, W. C. (2022). Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine. Cancer Cell International, 22(1), 206.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1-2), 81-95.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as a standard in environmental

effectiveness of Bio-catharanthine on peanut (*Arachis hypogea* L.) Lurik cultivar. In 7th International Conference on Biological Science (ICBS 2021) (pp. 383-387). Atlantis Press.

- Saulo M, S., Silva, P. S., Campos, J. M. S., & Viccini, L. F. (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. Caryologia, 62(4), 326-333.
- Slamet, A., Andarias, S. H., Bahrun, A. H., & Mantja, K. (2019, February). Induction of Lili Hujan polyploid (*Zephyranthes rosea* L.) with ethanolic extract of Tapak Dara leaf (*Catharanthus roseus* L.) G. Don.) to increase its economic value. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 235, No. 1, p. 012102). IOP Publishing.
- Smith, R. H. (2013). Plant tissue culture: techniques and experiments. Academic Press.
- Yanagida, M. (2014). The role of model organisms in the history of mitosis research. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 6(9), a015768.