مجلة جامعة النهرين المجلد ١٦ العدد(١) آذار، ٢٠١٣ ص 12- 19
العلوم

التأثير الوراثي الخلوي للمستخلص المائي الخام لجذور نبات الفجل .*Raphanus sativus* L على خلايا القمم النامية لجذور البصل .*Allium cepa* L

رشا كريم محمد السعدي
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة بغداد.
E-mail: rasha_kareem7@yahoo.com.

الخلاصة

أجريت الدراسة الحالية للكشف عن التأثيرات الوراثية الخلوية للمستخلص المائي لجذور نبات الفجل *Raphanus sativus* كأحد نباتات العائلة الصليبية Brassicaceae المهمة على خلايا القمم النامية لجذور البصل *Allium cepa* باستعمال أربعة تراكيز (5,10,20,40) ملغم/ سم^3 ولمدة أربعة ساعات وبالاعتماد على بعض معايير التحليلات الوراثية الخلوية وهي دليل الانقسام ودليل الطور والزيغ الكروموسومي أو الحالات الشاذة، ولوحظ أن المعاملة بهذا المستخلص أدت إلى خفض دليل الانقسام كنسبة مئوية من السيطرة إلى دون 50% (حسب هذه الدراسة) وخاصة عند المعاملة بالتراكيز 10و 40 ملغم/سم^3 حيث وصل دليل الانقسام 35.33% و 45.33% على التوالي، مما يدل على تأثيره السمي وشبه المميت وكذلك اظهر المستخلص قابلية تطفيرية اذ ظهرت حالات مختلفة من الزيغ الكروموسومي و الحالات الشاذة متمثلة بالاستوائي المتوقف بلغت أعلى نسبة لها 32.42% عند المعاملة بالتركيز 5 ملغم/ سم^3 والاستوائي المتميع، وحالات أخرى غير اعتيادية مثل الجسور والكروموسومات المتأخرة والانحراف في الأقطاب في الطورين الانفصالي والنهائي.

المقدمة

استعملت العديد من النباتات الطبية ومستخلصاتها كدواء منذ آلاف السنين لاحتوائها على مركبات كيمونباتية (phytochemicals) مختلفة ذات فعالية بيولوجية التي من الممكن أن تكون علاج للعديد من الأمراض وخاصة مرض السرطان[1]. يعد نبات الفجل *Raphanus sativus* احد نباتات العائلة الصليبية cruciferae او Brassicaceae المهمة. وهو عشبه حولية أو ثنائية الحول جذوره من النوع الوتدي (tap roots) تحتوي نباتات العائلة الصليبية العديد من الخضراوات المهمة اقتصاديا والتي تحتوي على العديد من المركبات ذات الخواص العلاجية والصيدلانية[2]. تحتوي جذور وأوراق نبات الفجل على العديد من المركبات الكيمونباتية تتضمن الكومارينات coumarins، القلويدات alkaloids، مركبات نيتروجينية nitrogenious compounds، هرمون الجبرلين gibberellin، كلايكوساينوليت glycosinolate، أحماض عضوية، مركبات فينولية، صبغات ومركبات كبريتية مثل السلفورافان sulforaphane [3].

استعمل النبات في الطب بجوانب عدة إذ استعمل في علاج أمراض الكبد والجهاز التنفسي، ولوحظ أن عصير جذوره له فعالية ضد بكتيرية وخاصة ضد *Bacillus subtlis, Salmonella typhi, Psudomonas aeruginosa* [4]. واستعمل لعلاج الإصابات الفيروسية خاصة فيروس Herps [5]. يعد نبات الفجل من النباتات المحفزة لحركة الأمعاء [6]. كما يحتوي كغيره من أجناس العائلة الصليبية على مجموعة من المركبات المهمة لمنع حدوث السرطان وكذلك في قتل أنواع عدة من الخلايا السرطانية، فضلا عن دورها في الحماية من المسرطنات anti-cancer والمطفرات anti-mutagens مثل السايتوكاينينات وغيرها التي تعمل كمضادات للأكسدة وحماية جسم الإنسان[7]. ولعدم وجود دراسات محلية اهتمت بدراسة التأثير السمي والوراثي لهذا النبات في الخلايا الحية، لذا جاءت هذه الدراسة التي تعد جزء من دراسة موسعة للتحري عن فعالية المستخلص الخام لجذور الفجل في الانقسام الميتوزي للخلايا المرستيمية لجذور البصل.

المواد وطرائق العمل

دراسة تأثير عصير جذور نبات الفجل الخام في فعالية الانقسام الميتوزي للخلايا المرستيمية لجذور البصل.

جمع النبات وتحضير المستخلص النباتي

تم الحصول على نبات الفجل من السوق المحلية واختيرت الجذور ذات الحجم المتوسط والكبير الممتلئة الجديدة، ذات الجلد الطري والسليم نظفت جيداً من الأتربة أن وجدت بوساطة غسلها بماء الحنفية مع إزالة الأجزاء غير المرغوب فيها تم وزن الجذور مباشرة وقطعت إلى أجزاء صغيرة جداً، ثم أضيف إليها الماء المقطر على أساس وزن/ حجم ثم وضعت في الخلاط الكهربائي.

تم الحصول على العصير الخام الطازج بعد ترشيح الخليط بعدة طبقات من الشاش الطبي النظيف ثم طرد الراشح مركزيا" باستعمال جهاز الطرد المركزي للحصول على راشح رائق خالي من الشوائب ثم وزع الرائق على أطباق بتري ويراعى وزن الأطباق قبل وضع المستخلص ثم وضع في الحاضنة على درجة حرارة 37مْ ولمدة 48 ساعة للحصول على المسحوق الجاف للمستخلص وبعدها حفظ في الثلاجة على درجة حرارة ٤مْ لحين الاستعمال [8].

تأثير مستخلص جذور نبات الفجل الخام في فعالية الانقسام المايتوزي للخلايا المرستيمية لجذور البصل

اعتمدت طريقة الباحثين Sharma and Sharma [9] في إجراء التجربة وتحضير المحاليل الخاصة بها وكالاتي:-

١. زرعت الأبصال بعد تنظيفها جيدا" في قناني مناسبة حاوية على ماء الحنفية وبعد نمو الجذور إلى طول (0.5 – 1) سم.
٢. نقلت إلى قناني أخرى حاوية على المستخلص الطازج المحضر بالتراكيز (صفر،5،10،20،40) ملغم/ سم^3 وبمعدل ثلاثة مكررات للتركيز الواحد، وتركت لمدة أربعة ساعات للمعاملة.
٣. بعد انتهاء فترة المعاملة قطعت الجذور وحفظت في مثبت كارنوي (3 حجم إيثانول: 1 حجم حامض الخليك الثلجي) المحضر آنيا" لمدة 24 ساعة، نقلت الجذور بعدها إلى قناني حاوية على 70% إيثانول لحين إجراء الفحص.
٤. حضرت شرائح زجاجية باستعمال صبغة أسيتوكارمين وفحصت 1000 خلية لكل مكرر.

حساب دليل الانقسام ودليل الطور ودليل الحالات الشاذة وفقا" لـ [11,10] وحسب المعادلات الآتية :

دليل الانقسام = (عدد الخلايا المنقسمة/ العدد الكلي للخلايا) x 100

دليل الطور = (عدد خلايا الطور/ عدد الخلايا المنقسمة) x100

دليل الحالات الشاذة = (عدد الخلايا الشاذة للطور/ العدد الكلي للخلايا في الطور نفسه) x100.

التصميم التجريبي والتحليل الإحصائي

صممت التجارب وفق التصميم العشوائي الكامل وبثلاث مكررات لكل معاملة وحللت النتائج باستعمال البرنامج الإحصائي SPSS وقورنت متوسطات حسب اختبار دنكن Duncan's متعدد الحدود لتحديد الفرو قات المعنوية بين متوسطات دليل الانقسام عند مستوى احتمالية $P\leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

تأثير مستخلص جذور نبات الفجل الخام في الانقسام المايتوزي في خلايا القمم النامية لجذور البصل

دليل الانقسام

تراوح دليل الانقسام في جذور السيطرة (3.53) ووصل إلى 1.06 و3.26 في خلايا الجذور المعاملة بالمستخلص، ولوحظ وجود فروق معنوية بين متوسط دليل انقسام السيطرة وجذور المعاملة بالتراكيز المستعملة (جدول (١)). وحصل انخفاض في دليل الانقسام في خلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لجذور الفجل عند التراكيز (40,20,10) ملغم/ سم^3 وصلت (1.36,1.66,1.06) على التوالي ولم تسجل فروقات معنوية بين السيطرة والتركيز 5 ملغم/ سم^3 (جدول (1)) و(شكل (1)) كما انخفضت النسبة المئوية لدليل الانقسام من السيطرة في خلايا الجذور المعاملة بالتراكيز 40,10 ملغم/ سم^3 إلى اقل من 50% حيث سجلت 45.33%، 35.33% على التوالي. انخفضت النسبة المئوية من السيطرة إلى 50% عند التركيز 20 ملغم/ سم^3 محققه 55.33% وسجلت النسبة المئوية من السيطرة مقاربة للسيطرة

عند التركيز 5 ملغم/ سم^3 حيث كان 108.66% (جدول (2)). أكد كل من [14,13,12] أن المواد والمستخلصات التي تسبب انخفاضا"في دليل الانقسام إلى 50% أو دون ذلك فأنها ذات تأثير سمي أو شبه مميت أو قد يعود انخفاض دليل الانقسام إلى تأثير المستخلص الذي ممكن أن يتداخل مع أطوار الانقسام وبالتالي منع نواة الخلية من الدخول الى الطور التمهيدي و بالتالي إيقاف الانقسام الخيطي خلال طور السكون interphase أو من خلال زيادة فترة طوري G2 و S او تثبيط عملية بناء البروتين والـ DNA [15].

الطور التمهيدي Prophase

تراوح متوسط دليل الطور التمهيدي في خلايا جذور السيطرة (30.66) و بين 48.07,2.77 في خلايا الجذور المعاملة (جدول 1)، انخفضت النسبة المئوية من السيطرة لهذا الطور في خلايا الجذور المعاملة بالتراكيز (40,20,10) ملغم /سم^3 حيث سجلت (23.93%,9.03%,69.43%) على التوالي وزادت عند استعمال التركيز 5 ملغم/سم^3 (جدول (2)).

الطور الاستوائي Metaphase

ظهر الطور الاستوائي في الجذور غير المعاملة نسبة 27.77، أما في الجذور المعاملة فقد تراوح بين 59.31-47.14 (جدول (1))، وارتفعت النسبة المئوية من السيطرة لهذا الطور في خلايا الجذور المعاملة بالتراكيز (40,20,10,5) ملغم /سم^3 إلى أكثر من 100% (جدول (2)) وذلك ربما لتوقف الخلايا في الطور الاستوائي C-Metaphase بنسبة تراوحت بين (32.42-12.5)% لجميع المعاملات (جدول (2))، شكل (2- أ) وهذا يدل على أن المستخلص المدروس يحتوي على مركبات لها فعالية مضادة للنبيبات الدقيقة وبلمرة التيوبيولين التي تكون خيوط المغزل لذلك تفشل الكروموسومات في إكمال اصطفافها في الصفيحة الاستوائية [17,16]. أو قد يكون التأثير في آليات الانقسام النووي وبالتالي يكون تأثيره في تكوين وتوزيع خيوط المغزل وإيقاف الانقسام الخلوي [1]. ومن الحالات الشاذة التي شهدت في هذا الطور الاستوائي المتميعSticky metaphase (شكل(2-ب)) في جميع الخلايا المعاملة بالتراكيز (40,20,10) ملغم /سم^3 ماعدا التركيز 5ملغم/ سم^3 وبنسبة تراوحت بين (22.22-2.38)% (جدول (1)). ويمكن أن يعزى تميع الكروموسومات إلى عملية إزالة بلمرة depolymerization الحوامض النووية او نتيجة التغيير في نمط تنظيم البروتينات النووية أو تكثيف ألدنا [18].

الطور الانفصالي Anaphase

كان متوسط دليل الطور الانفصالي في خلايا جذور السيطرة 13.19 وتراوح بين 16.57-3.65 في خلايا الجذور المعاملة بالتراكيز المستعملة (جدول (1)) وانخفضت النسبة المئوية من السيطرة عند المعاملة بالتراكيز 5, 10 ملغم/ سم^3 فقد وصلت 59.66,27.67% على التوالي (جدول (٢)) وذلك بسبب احتباس الخلايا في الطور الاستوائي.

الطور النهائي Telophase

وجد أن متوسط دليل الطور النهائي في خلايا جذور السيطرة (28.47) وتراوح بين (25.29-5.53) في خلايا الجذور المعاملة بالتراكيز المستعملة (جدول (١)). انخفضت النسبة المئوية من السيطرة تدريجيا عند المعاملة بالتراكيز اجمع حيث حققت 88.83,78.92,74.78,19.42% (جدول (2)). قد يعود السبب إلى احتباس الخلايا في الطور الاستوائي. شوهدت عدة حالات من الزيغ الكروموسومي في الطورين الانفصالي والنهائي وهي -1حالة الجسور Bridges في جميع التراكيز المدروسة وبنسبة تراوحت بين 55.55%، 8.33% (جدول (1))، (شكل (2-ج)). قد يعزى حدوث الجسور الكروموسومية في الانقسام الميتوزي الى تميع ولزوجة الكروموسومات نتيجة لتأثير المستخلص في تركيب الكروموسوم ولفقدان اجزاء من الكروموسومات نتيجة القطع بفعل قوى خيوط المغزل المؤثرة في جهاز المغزل الساحبة لها او ان لزوجة الكروموسومات تمنع الكروموسومات الشقيقة من الانفصال لذلك تبقى متصلة بوساطة الجسور [19-20]. 2- حالة الكروموسوم المتأخر lagging chromosome حيث ظهرت عند المعاملة بالتركيزين 10, 40 ملغم/ سم^3 وكانت 5.55 ,6.66% (جدول (1))، (شكل (2-د)) التي تحدث

نتيجة عدم تزامن حركة بعض الكروموسومات باتجاه الأقطاب أو حدوث خلل في ارتباط الكروموسومات بخيوط المغزل مما أدى إلى ظهور الكروموسومات المتأخرة [21]. 3- الانحراف فـي الأقطـاب polar deviation وهـي احـد أنـواع الزيـغ الكروموسومي حيث ظهرت عند المعاملة بالتراكيز 20 ,40 ملغـم/سـم^3 وكانـت نسـبتها 17.26% و 9.5%2 (جـدول (1)، شـكل (2-هـ)) يفسـر انحـراف الأقطـاب تـأثير المسـتخلص فـي النبيبـات الدقيقـة المكونة لجهاز المغزل [22].

أظهرت أن مستخلص جذور نبات الفجل الذي يُعد من أكثر النباتات الجذرية المتوافرة التي تؤكل في العراق، أن لـه تأثير سمي سبب في إيقاف الانقسام الخلوي في خلايا القمة الناميـة فـي جـذور البصـل يعـد هـذا الاختبـار أحـد السـبل المستخدمة في تقييم السمية الوراثية Genotoxicity للمواد المختلفة، وللكشـف عـن التـأثير المضـاد للانقسـام الميتـوزي والتوصل إلى آلية التأثير وفي أي مرحلة من مراحل الانقسام قد يؤثر[23].

ومما يدعم هذه النتائج، هو تأثير جذور هذا النبات في الخلايا السرطانية إذ توصل [3] امتلاك المستخلص المائي لجذور نبات الفجل تأثيرا" سميا" قاتلا" للخط الخلوي السرطاني خارج الجسم الحي وهو خلايا جنين الفأر الليفية FT3. وتعود هذه الفعالية لما يحويه جنس *Raphanus* من مركبات فعالة كثيرة ومتنوعة ومنها Diaminotoluene التي تعمل على الحماية والوقاية من الأورام السرطانية والسايتوكاينين Cytokinin الذي اظهر فعالية عالية في قتل الخط الخلوي السرطانيHela-cell line [24].

جدول (١)

دليل الانقسام الميتوزي وأطواره والنسبة المئوية للحالات الشاذة في جذور البصل *A.cepa* المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص جذور نبات الفجل لمدة أربع ساعات.

التركيز ملغم/سم^3	دليل الانقسام ± S.D**	دليل الأطوار				دليل الحالات الشاذة				
						الاستوائي		الانفصالي- النهائي		
		التمهيدي	الاستوائي	الانفصالي	النهائي	متوقف	متميع	جسور	كروموسوم متاخر	انحراف في الاقطاب
السيطرة	3.53±0.57a*	30.60	27.77	13.19	28.47	0	0	0	0	0
5	3.26±1.02a	48.07	47.14	3.65	5.53	32.42	0	55.55	0	0
10	1.06±0.64c	21.29	49.53	7.87	21.29	12.5	20.83	16.66	5.55	0
20	1.66±0.45b	2.77	59.31	15.75	22.47	14.28	2.38	8.33	0	7.26
40	1.36±0.11b	7.34	50.76	16.57	25.29	14.81	22.22	13.33	6.66	9.52

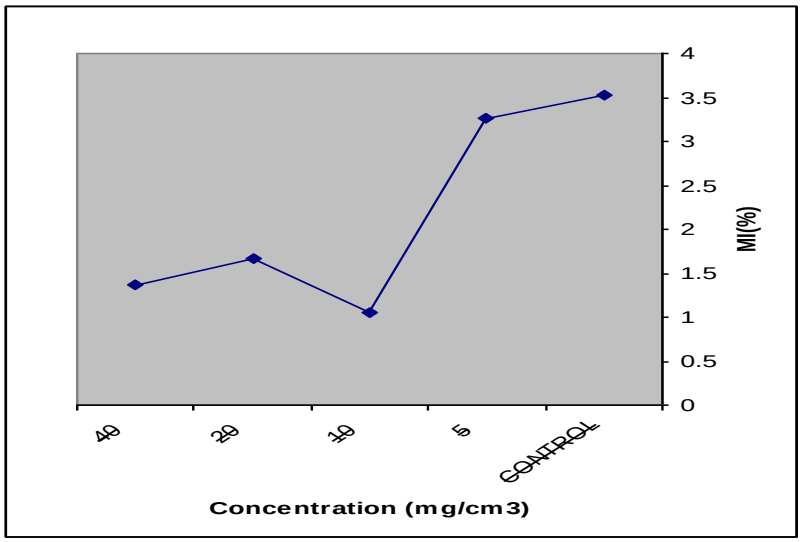
*الحروف المختلفة ضمن العمود الواحد تشير إلى وجود فروق معنوية عند مستوى $P \leq 0.05$

** الانحراف المعياري Standard deviation

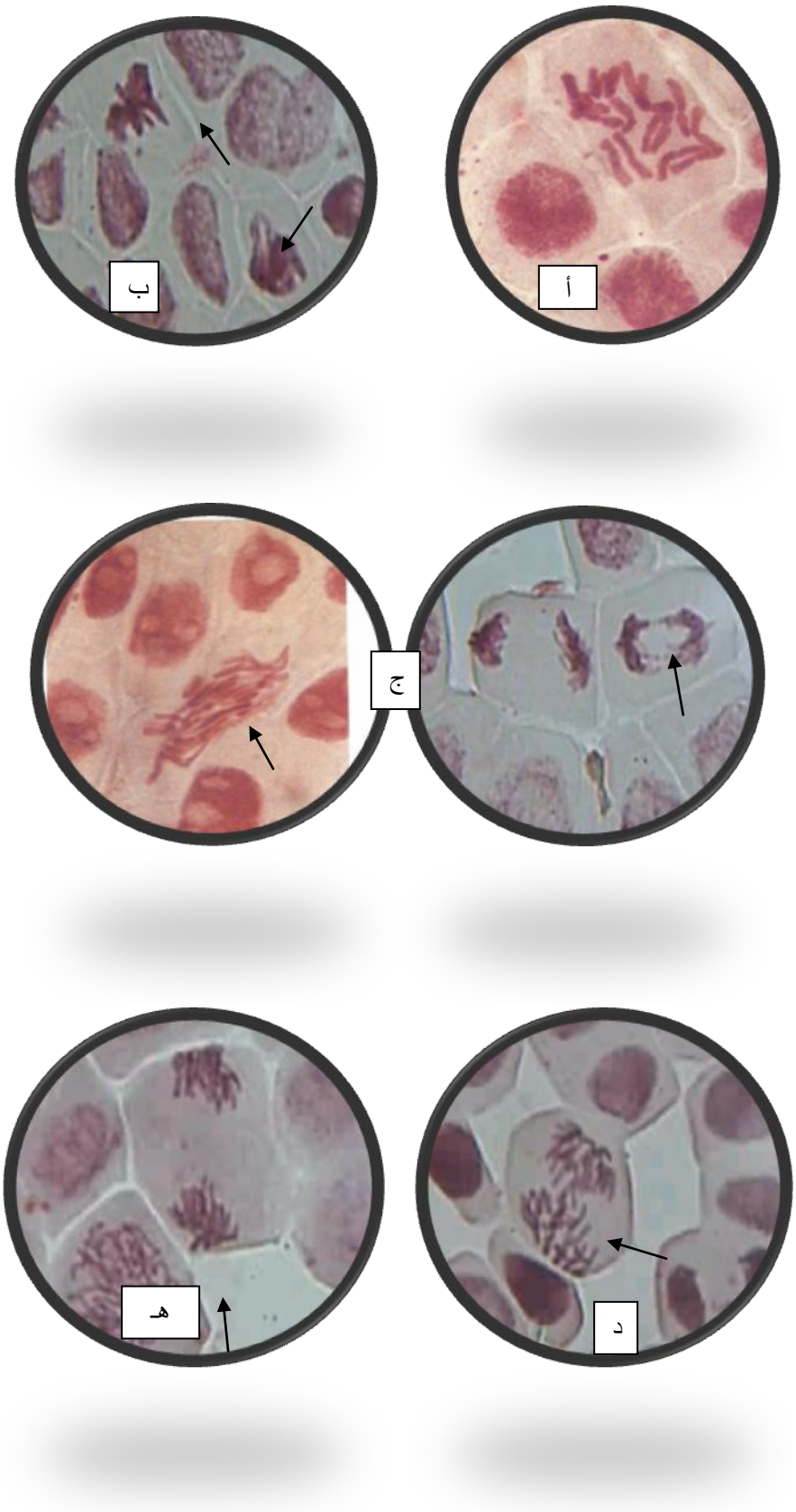
جدول (2)

النسبة المئوية من السيطرة لدليل الانقسام الخيطي والأطوار في جذور البصل *A. cepa* المعاملة بتراكيز مختلفة من مستخلص جذور نبات الفجل الطازج لمدة أربع ساعات.

التركيز ملغم/ سم^3	دليل الانقسام (%)	دليل الأطوار (%)			
		التمهيدي	الاستوائي	الانفصالي	النهائي
5	108.66	156.78	169.75	27.67	19.42
10	35.33	69.43	178.35	59.66	74.78
20	55.33	9.03	213.5	119.40	78.92
40	45.33	23.93	182.78	125.62	88.83



شكل (1) دليل الانقسام الخيطي MI في خلايا جذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي الخام لجذور الفجل وبتراكيز مختلفة.



شكل (2)
أ- خلية متوقفة بالطور الاستوائي.
ب- استوائي متميع.
ج- جسور في الطوري الانفصالي والنهائي.
د- كروموسوم متاخر.
هـ- انحراف بالأقطاب.

Reference

[1] Irena, K. Synthetic, natural comarins as cytotoxic agent. Curr. Med. Chem Anti-cancer Agent, 5: 29-46, 2005.

[2] USDA, United States Department of Agriculture. The Radish. 2011.

[3] Perez-Gutierrez, R.M., Perez, R. L. *Raphanus sativus* L. Radish, Their chemistry and biology. The Scientific World J., 4:811-837, 2004.

[4] Caceres, A. Screening on antimicrobial activity of plant popular in Guatemala for the treatment of dermato mucosal diseases. J. Ethnopharm. 20: 223-237, 1987.

[5] Weilan,W.; Jin, Z.; Zhongda, L. and Menga, L. Hypotensive constituents of laifuzi (semen raphani). Zhongcacoyao, 18:101-103, 1987.

[6] Yong, J. K.; Kug, C.Y.; Min, K.H. and Kyu, C.B. Radish extract stimulates motility of the intestine via the muscarinic recptors. J.Pharmacol., 52: 1031-1036, 2000.

[7] Harborne, J.B., Baxter, H. Phytochemical Dictionary. A hand book of Bioactive compound from plants. Taylor and Francis, London, 1993.

[8] Rathees, M., Helen, A. Anti-inflammatory of *Ruta graveolans* L. on carrageen induced paw edema in Wister male rats. Afric.Biotec., 6(10):1209-1211, 2007

[9] Sharma, A. K., Sharma, A. Chromosomes Techniques, Theory and Practice 3rd Edition. Butter Worth's Company. London. Boston. PP. 711, 1980.

[10] Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., Hardin, J. The world of the cell. 5th Edition. The Benjamin/Cummings Pub. Co, Inc. New York. 2003.

[11] Ozmen, A., Sumer, S. Cytogentic effect of kernel extract from *Melia azedarach* L. Cyto., 57:290-293, 2004.

[12] Antonise-Wiez, D. Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* the influence of leda. Kirn. Hiostochem. Cytobiol. 26:76-96, 1990.

[13] Panda, B.B. and Sahu, U.K. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the orauge phosphorus insecticide Feusul fothion Cytobiol., 42:147-155, 1985.

[14] Sharma, C.B.S.R. Plant meristems as monitors of gentic toxicity of environmental chemicals. 1983.

[15] EL-Gharmery, A., EL-Nahas, A. I., ansour, M. M. The action of atrazine herbicides as inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids contents in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. Cytologia, 55:209-215, 2000.

[16] Soliman, M. I. genotoxicity testing of Neem plant (Azadirachta indica A. Juss) Using the *Allium cepa* chromosomes aberration assay. J. Biol. Sci., 1:1021-1027, 2001.

[17] Basbülbül, G.; Özmen, A.; B.; iyik, H. H., Şen, Ö. Anti mitotic and anti bacterial effects of the *Primula veris* L. flower extracts. Caryologia. 16 (1): 88-91, 2008.

[18] Yilidiz, M., Arikan, E.S. Genotoxicity testing of quizalofapp-ethyl herbicides using the *Allium cepa* ansphase- telophase chromosomes aberration assay. Cyto. 61(1): 45-52, 2008.

[19] Bader, A., Ghareeb, A., EL-din, H. A. Effect of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa* . Heredit. 117: 23-29, 1999.

[20] Sifa, T. Genotoxicity of five foods preservation tested on root tips of *Allium cepa* L. Mut. Res. 626: 4-14, 2005.

[21] EL-Gharmery, A. A., Elkholy, M. A., EL-Yousser, A. Ealuation of cytobiological effects of Zn^{2+} in relation to germination and growth of *Nigella sativus* L. and *Triticum aestrium* L. Mutation Resarch, 537: 29-41, 2003.

[22] Celik, T. A., Aslantük, Ö. S. Anti mitotic and anti genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells Bio. Brasti., 61(6) : 693-697, 2006.

[23] Grant, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium* Mutation Research. 99:237-291, 1982.

[24] Mal- Nam, K., Ji-Chul, J., IK-Mo, L., Han-Sup, L. and Jin-San, Y. Toxicity and biodegradtion of diamines. J. Environ. Sci. Health., B 37: 53-64 2002.

Abstract

This study was carried out to investigate the cytogenetic effects of crude extract from roots of *Raphanus sativus* L.(Brassicaceae) on the mitosis of root tips of *Allium cepa* L. using four concentrations (5,10,20 or 40)mg/cm^3, for 4 hrs of treatment period. This study included some cytogenetic analysis such as mitotic index, phase index, chromosome aberrations index. Data showed that treatment with this extract led to reduce the mitotic index less than 50% when treated with 10, 40 mg/cm^3 was 35.33% and 45.33%. This reduction considered to be toxic and sub lethal effects. Since it arrested the cells at metaphase in every treatments and caused chromosomal aberrations including sticky metaphase bridges, lagging chromosome, polar deviation in anaphase-telophase.