



كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

الكشف عن السمية الوراثية لمستخلص نبات الصبار *Aloe vera* باستعمال المؤشرات الجزيئية والخلوية

رسالة مقدمة الى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علوم الحياة / علم النبات / علم الوراثة الجزيئية

من قبل

غيث منذر فاضل

بكالوريوس علوم - قسم علوم الحياة - 2013

كلية التربية للعلوم الصرفة – ابن الهيثم / جامعة بغداد

بإشراف

أ. م. د. نضال نعمة حسين

1437 هـ

2015 م

الخلاصة

نبات الصبار *Aloe vera L.* من النباتات المهمة والتي تستعمل حالياً بشكل واسع في مجال صناعة الأدوية و يضاف هلام الصبار الى اغلب مستحضرات التجميل مع بعض المواد الغذائية في جميع انحاء العالم , لذا تم دراسة التأثيرات السمية الخلوية والوراثية لتراكيز مختلفة من المستخلص الخام , الكحولي و المائي لهلام الصبار في جذور نبات البصل كنظام حياتي وعند مدد تعريض مختلفة 24, 48, و 72 ساعة .

عرضت جذور نبات البصل للتراكيز 2%, 5%, 10%, 20%, و 40% (حجم/حجم) من المستخلص الخام وللتراكيز 5%, 10%, 20%, 30%, و 50% (حجم/وزن) من المستخلص الكحولي وللتراكيز 25%, 50%, 100%, 150%, و 200% (حجم/وزن) من المستخلص المائي لهلام الصبار ولمدد تعريض 24, 48, و 72 ساعة و درس تأثير هذه المستخلصات في متوسط طول جذور نبات البصل و بعض الصفات الخلوية كدليل الانقسام , دليل الاطوار و نسبة التشوهات الكروموسومية وانواعها , فضلاً عن الدراسة الوراثية باستعمال تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا DNA Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) في جذور نبات البصل المعرضة للمستخلصات .

اظهرت النتائج بأن جميع مستخلصات هلام الصبار أدت الى تثبيط متوسط طول جذور البصل ويزداد التثبيط كلما زاد تركيز المستخلص , وحصل على التركيز نصف المؤثر EC50% للمستخلصات المستعملة هو 10% للمستخلص الخام , 20% للمستخلص الكحولي و 100% للمستخلص المائي . يتضح بأن المستخلص الخام كان اكثر تأثيراً في متوسط طول جذور نبات البصل يليه المستخلص الكحولي ثم المستخلص المائي .

اوضحت نتائج الدراسة الخلوية بأن جميع مستخلصات هلام الصبار أدت الى انخفاض معنوي في دليل الانقسام الميتوزي (MI%) لجذور نبات البصل مقارنة بمعاملة السيطرة وازداد انخفاض دليل الانقسام بزيادة تراكيز المستخلصات ولكنه لم يتأثر بمدد التعريض المختلفة . وأدت التراكيز 10%, 20%, و 150% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي الى خفض دليل الانقسام 50% تقريباً مقارنة بمعاملة السيطرة لذا عدت هذه التراكيز بشبه المميئة , اما التراكيز الاعلى من 30%, 50%, و 200% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي , على التوالي خفضت دليل الانقسام الى 22% تقريباً مقارنة بمعاملة السيطرة لذا عدت هذه التراكيز ذات تأثيرات مميئة .

اظهرت النتائج كذلك انخفاض دليل الطور التمهيدي معنوياً و ارتفاع في دليل الطور الاستوائي في خلايا جذور البصل المعاملة بالمستخلصات مقارنة بمعاملة السيطرة .

ظهرت العديد من التشوهات الكروموسومية في الجذور المعاملة بمستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) وقد ازدادت نسبة هذه التشوهات بزيادة تراكيز المستخلصات وزيادة مدة التعريض وكانت اكثر التشوهات تكراراً هي اللزوجة الكروموسومية Stickiness, التشتت الكروموسومي Disturbed chromosome , الجسور الكروموسومية Bridge , كروموسومات الطور الاستوائي الكولشيسي C-mitosis و الكروموسومات المتأخرة Vagrant فضلاً عن تشوهات كروموسومية اخرى اقل تكراراً كأشكال النجمي النهائي Star telophase.

درست التأثيرات السمية لمستخلصات هلام الصبار على المستوى الجزيئي وباستعمال تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا (RAPD) . استعملت عشرة بادئات عشوائية , سبعة منها فقط اعطت حزم متعددة الاشكال مع جميع العينات المدروسة تراوحت اوزانها الجزيئية بين 100-1600 زوج قاعدة .

بينت نتائج التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا (RAPD) لعينات جذور البصل المعاملة بمستخلصات هلام الصبار وجود اختلافاً واضحاً في عدد حزم الدنا المتضاعفة وفي اوزانها الجزيئية مقارنة بمعامله السيطرة , وكانت التراكيز العالية (اعلى من التركيز نصف المؤثر) من مستخلصات هلام الصبار اكثر تأثيراً في دنا جذور نبات البصل من خلال ظهور او اختفاء عدد اكبر من حزم الدنا DNA مقارنة بمعاملة السيطرة . لوحظ كذلك انخفاض قيمة الاستقرار الجيني (%GTS) بشكل ملحوظ في دنا الجذور المعرضة للتراكيز العالية (التركيز الاعلى من التركيز نصف المؤثر) من مستخلصات هلام الصبار , لذا يمكن عدّ هذه التراكيز سامة وراثياً .

رسمت شجرة القرابة الوراثية للعينات المعرضة لمستخلصات هلام الصبار فضلاً عن عينة السيطرة باستعمال مقياس Jaccard للتباين الوراثي ووضحت النتائج انعزال العينات المعاملة بالتراكيز العالية 40% , 50% و 200% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي عن العينات الاخرى وعن معاملة السيطرة لذا يمكن عد طريقة الـ RAPD كفاءة في الكشف و تقدير السمية الوراثية لمستخلص هلام الصبار الخام , الكحولي والمائي .

الصفحة	الموضوع	ت
	الفصل الأول	
1	المقدمة	1-1
	الفصل الثاني	
	إستعراض المراجع	

4	تصنيف نبات الصبار	1-2
5	<i>Aloe vera</i> L. (<i>Aloe barbadensis</i> (Miller)) الصبار	2-2
6	المكونات الفعالة	3-2
9	الاستعمالات الطبية لنبات الصبار	4-2
12	السمية الوراثية Genotoxicity	5-2
15	<i>Allium cepa</i> L. اختبار القمم النامية لنبات البصل	6-2
16	استعمال المؤشرات الجزيئية في دراسة السمية الوراثية	7-2
	الفصل الثالث	
	المواد وطرائق العمل	
21	الأجهزة والمواد الكيميائية المستعملة	1-3
21	الأجهزة المستعملة	1-1-3
22	المواد الكيميائية المستعملة	2-1-3
23	مصادر نبات الصبار <i>Aloe vera</i> L.	2-3
23	مصادر نبات البصل <i>Allium cepa</i> L.	3-3
23	تحضير مستخلصات هلام الصبار	4-3
23	المستخلص الخام لهلام الصبار	1-4-3
23	المستخلص المائي و الكحولي لهلام الصبار	2-4-3
24	ايجاد التركيز نصف المؤثر EC50%	5-3
24	دراسات الوراثة الخلوية	6-3
24	المحاليل المستعملة في الدراسة الخلوية	1-6-3
25	معاملة جذور نبات البصل بمستخلصات هلام الصبار	2-6-3
25	التثبيت والحفظ	3-6-3
25	الفحص الخلوي	4-6-3
26	تحليل نتائج دراسة الوراثة الخلوية	5-6-3
26	الدراسة الجزيئية	7-3
26	تعريض جذور نبات البصل لمستخلصات هلام الصبار	1-7-3
26	المحاليل المستعملة في استخلاص الدنا	2-7-3
28	استخلاص الدنا	3-7-3
29	قياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته	4-7-3
29	الترحيل الكهربائي لعينات الدنا على هلام الاكاروز	5-7-3
29	المحاليل المستعملة في ترحيل الدنا على هلام الاكاروز	1-5-7-3
30	طريقة عمل الترحيل الكهربائي لعينات الدنا على هلام الاكاروز	2-5-7-3
30	تحضير تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا Random amplified polymorphic	6-7-3
31	المواد والمحاليل اللازمة لاجراء تفاعلات الـRAPD	1-6-7-3
32	طريقة عمل تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال	2-6-7-3

	للدنا (RAPD)	
34	تحليل نتائج الدراسة الوراثية	7-7-3
	الفصل الرابع	
	النتائج والمناقشة	
35	النتائج	1-4
35	تأثير مستخلصات هلام الصبار في متوسط طول جذور نبات البصل	1-1-4
37	دراسات الوراثة الخلوية	2-1-4
37	تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الانقسام MI %	1-2-1-4
39	تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الاطوار والتشوهات الكروموسومية	2-2-1-4
55	الدراسة الجزيئية	3-1-4
55	تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD)	1-3-1-4
68	تحديد نسبة الاستقرار الجيني Genomic template stability(GTS%)	2-3-1-4
70	مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) لعينات البصل <i>Allium cepa</i> اعتماداً على نتائج تقانة الـ RAPD	3-3-1-4
72	المناقشة	2-4
72	تأثير مستخلصات هلام الصبار في متوسط طول جذور نبات البصل	1-2-4
73	تأثير مستخلصات هلام الصبار في فعالية الانقسام المايوتوزي للخلايا المرستيمية لجذور البصل	2-2-4
73	تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الانقسام MI%	1-2-2-4
75	تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الاطوار	2-2-2-4
76	التشوهات الكروموسومية	3-2-2-4
78	الدراسة الجزيئية	3-2-4
80	الاستنتاجات والتوصيات	
82	المصادر العربية	
84	المصادر الأجنبية	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	ت
8	المواد الفعالة التي يحتوي عليها هلام الصبار	1

21	الأجهزة المستعملة في الدراسة	2
22	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	3
31	البادئات العشوائية المستعملة مع تتابعاتها	4
41	متوسط دليل الانقسام ومتوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة لمستخلص الهلام الخام لنبات الصبار	5
42	متوسط دليل الانقسام و متوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لهلام الصبار	6
43	متوسط دليل الانقسام ومتوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار	7
51	انواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام الصبار	8
52	انواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار	9
53	انواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار	10
58	الحزم المفقوده والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الخام لهلام الصبار	11
59	الحزم المفقوده والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لهلام الصبار	12
60	الحزم المفقوده والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار	13
69	نسبة الاستقرار الجيني الـGTS% في القمم النامية لجذور البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار	14

قائمة الاشكال

الصفحة	العنوان	ت
5	نبات الصبار	1
8	هلام الصبار	2
18	خطوات تفاعل PCR	3
36	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل	4
36	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل	5
36	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل	6
44	دليل الانقسام %MI في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الخام لهلام الصبار	7
44	دليل الانقسام %MI في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لهلام الصبار	8
44	دليل الانقسام %MI في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار	9
45	دليل اطوار الانقسام المايئوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام لصبار	10
46	دليل اطوار الانقسام المايئوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار	11
47	دليل اطوار الانقسام المايئوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار	12
50	نسبة تشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام الصبار	13
50	نسبة تشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار	14
50	نسبة تشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار	15
54	انواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار وباوقات تعريض مختلفة	16
61	نواتج تضاعف البادئ OPA-2 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder	17
62	نواتج تضاعف البادئ OPA-3 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder	18
63	نواتج تضاعف البادئ OPA-4 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder	19

64	نواتج تضاعف البادئ OPA-7 المرحلة على هلام الأكاروز Ladder مع الدليل الحجمي 1.5%	20
65	نواتج تضاعف البادئ OPA-8 المرحلة على هلام الأكاروز Ladder مع الدليل الحجمي 1.5%	21
66	نواتج تضاعف البادئ OPA-9 المرحلة على هلام الأكاروز Ladder مع الدليل الحجمي 1.5%	22
67	نواتج تضاعف البادئ OPA-10 المرحلة على هلام الأكاروز Ladder مع الدليل الحجمي 1.5%	23
71	شجرة القرابة الوراثية لعينات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار	24

قائمة المختصرات

dCTP	Deoxy cytosine triphosphate
dGTP	Deoxy guanine triphosphate
dTTP	Deoxy thymine triphosphate
dNTPs	Deoxy nucleotide triphosphates
EC	Effective concentration
SE	Standard error
PCR	Polymerase chain reaction
GTS	Genomic template stability
RAPD	Random amplified polymorphic
TBE	Tris-Boric acid-EDTA
ATP	Adenosine triphosphate
	Deoxyribonucleic acid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
IL	Interleukin
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
INF	Interferon
SPSS	Statistical package for the social sciences
SSR	Simple sequence repeat

ينتمي نبات الصبار (*Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* (Miller))) الى عائلة Asphodelaceae . وهو احدا انواع جنس الـ *Aloe* , ويعد هذا النبات من نباتات المناطق الجافة وشبه الجافة , اما الموطن الاصلي له في السواحل الشمالية والغربية لقارة افريقيا ومنحدراتها (النعمي, 2010) . يحتوي الجنس *Aloe* على 300 نوعا مختلفاً , ولكنها لا تملك جميعا الصفة العلاجية الشافية , بينما النوع الوحيد الذي يحتوي علي مادة الألوين Aloin الذي هو عبارة عن مادة مرت الطعم صفراء اللون وهو عبارة عن C-glycoside مشتق من Anthraquinone الذي يستعمل على نطاق واسع في العلاج ويسمي بالصبار *Aloe vera* الذي ينمو بكثرة في جزر البرباديوس، ومنها أنتشر لكي ينمو في أوروبا , أمريكا والكثير من بلدان العالم . استعمل نبات الصبار على مدى القرون , اذ وجد رسم نبات الصبار محفوراً على جدران المعابد منذ 4000 عاما قبل الميلاد في زمن قدماء المصريين واستعمل الصبار في صناعة المستحضرات الطبية و مستحضرات التجميل ولعلاج الكثير من الامراض واستعمل بكثرة في الطب الشعبي (Hegggers et al., 1996).

يحتوي نبات الصبار على مدى واسع من المركبات المهمة التي تستعمل بشكل واسع في صناعة الادوية وفي علاج العديد من الامراض . توجد اغلب هذه المواد الكيميائية في ورقة نبات الصبار . تحتوي طبقة الدائرة المحيطية على افرات الورقة الصفراء والمسماة *Aloe sap* , اما طبقة النسيج المتوسط *Mesophyll* فتحتوي على الهلام الجيلاتين والمعروف بهلام الصبار *Aloe vera gel* , وهو لب الورقة المخاطي *Mucilage* المحصور بين بشرتي الورقة العليا والسفلى وتحتوي هذه الطبقة على اكثر المواد الفعالة لنبات الصبار . وهلام الصبار عبارة عن مادة شفافة و رقيقة تشبه الهلام *Jelly like* , يحتوي على العديد من المواد الفعالة طبيياً اذ يكون غني بالمواد الكربوهيدراتية , الفيتامينات , المعادن , الانزيمات , السكريات المتعدد , المركبات الفينولية والاحماض العضوية (Boudreau, 2006) مما جعله ذات خصائص علاجية واسعة فاستعمل لعلاج امراض القلب (Choi et al., 2002) كمحفز للاستجابة المناعية و كمضاد للاكسده (Sa et al., 2005), وكمضاد للاورام (Yu et al., 2006) كمضاد للالتهابات (Reuter et al., 2008) وفي علاج الجروح الجلدية و الحروق (Feily and Namazi, 2009) كمضاد بكتيري و فطري (Renisheya et al., 2012). يدخل هلام الصبار بكثرة في تركيب العديد من المستحضرات التجميلية فوجد في اغلب مرطبات اليد والوجه, الصابون وصابون الحلاقة والشامبو وفي العطور وفي اغلب انواع مضادات الشمس (Stepanova et al., 2007) Sunblock.

ادى التقدم العلمي في جميع مجالات الحياة الى ارتفاع مستويات التلوث البيئي المحيط بالانسان سواء كانت ملوثات المياه او الهواء وقد شمل ايضاً التلوث البيئي معظم ما يتناوله الانسان من طعام وشراب او عقاقير ,اذ تحتوي غالباً على العديد من المواد الضارة بصحة الانسان و تشير التقارير الى زيادة في السنوات الأخيرة للاثار الجانبية غير المرغوب فيها والآثار السمية المحتملة للعديد من النباتات الطبية Phyto medicines (Effraim *et al.*, 2001; Ruffa *et al.*, 2002; Amida *et al.*, 2007; Konan *et al.*, 2007; Sowemimo *et al.*, 2007; Nwafor *et al.*, 2007) لذلك اهتم علماء الخلية والوراثة بالتقييم المستمر لتلك الملوثات وقياس السمية الخلوية و الوراثة لها Cytogenotoxicity وذلك باجراء العديد من التجارب باستعمال الكائنات الحية ,ومن الانظمة البيولوجية النموذجية المستعملة التي اثبتت قدرتها في تقييم التأثير التطفيري للملوثات البيئية هي *E.coli* (بكتريا) والخمائر (الفطريات) والباقلاء والبصل (النبات) والفنران والارانب وخلايا دم الانسان المزروعة مختبرياً (الثديات) والدروسوفلا (الحشرات) لما تتميز به تلك الكائنات من قصر دورة حياتها , قلة عدد كروموسوماتها و صغر حجمها وذلك من خلال العديد من الاختبارات كاختبار قياس نسبة الشذوذ الكروموسومي او اختبار الانوية الدقيقة وقياس دليل الانقسام المايوزي او المايوزي (Rank,2003) .

يُعتمد نظام القمم النامية لنبات البصل بسبب بعض المميزات المهمة لهذا النظام منها حساسيته العالية للاختلافات الوراثية , التشابه الكبير للخلايا المنقسمة في جذور نبات البصل , الحجم المنتظم لكروموسومات البصل وسهولة العمل معه مختبرياً وحقلياً من حيث سرعة النمو وتكوين عدد كبير من الجذور في وقت قصير (Fiskesj, 1985, 1988; Grant, 1992; Rank, 2003 Saxena *et al.*, 2005; Konuk *et al.*, 2007 ;Liman *et al.*,2011)

يصاحب تلك الاختبارات السابقة في تقييم السمية الوراثية للملوثات البيئية اجراء العديد من التقديرات البايوكيميائية وعلى المستوى الجزيئي مثل تقدير محتوى الاحماض النووية (DNA,RNA) او تقدير البروتينات كماً ونوعاً باستعمال الهجرة الكهربائية في هلام متعدد الأكريلاميد (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) فضلاً عن التفاعل العشوائي متعدد الاشكال للDNA RAPD-PCR وغيرها من الطرائق الجزيئية التي تمكن العلماء من معرفة الاساس الوراثي لتطهير بعض العوامل الوراثية الناتجة عن الملوثات البيئية . وبقياس السمية الوراثية على المستوى الجزيئي وجد ان الكثير من مستخلصات النباتات الطبية والبرية (الكمون , الكراويه , *Azadirachata indica*, *Rhaza stricta* وغيرها

والعديد من المركبات الكيميائية (مركبات النحاس وعنصر البورون وكلوريد الالمنيوم) واختبارها على العديد من الانظمة الحيوية كاستعمال نبات البصل او الباقلاء وجد بانها احدثت تأثيرات تطفيرية على المستوى الجزيئي من تغير لمحتوى الاحماض النووية او تغير للتعبير الجيني متمثلا في تغير الحزم البروتينية اوحزم المادة الوراثية دنا DNA والمقدرة بتفاعل التضاعف العشوائي متعدد الاشكال الـRAPD (Baeshin *et al.*, 2009; Cenkci *et al.*, 2009a , b2010a ; Al-zahrani *et al.*,2012; EL-Tarras *et al.*,2013) .

تعد النباتات مصدراً مهماً لصناعة العقاقير الطبية لاحتوائها على بعض المواد الكيميائية ذات الفعالية الحياتية لذا أعتمدت في تحضير الكثير من الادوية والعقاقير الطبية ونظراً لكثرة استعمال هلام الصبار في علاج العديد من الامراض وبدون تقييم علمي مسبق لذا تهتم هذه الدراسة في تقييم السمية الخلوية والوراثية التي تسببها مستخلصات هلام الصبار وبتراكيز مختلفة على القمم النامية لجذور نبات البصل . وتضمنت الدراسة :

- 1- الحصول على مستخلصات هلام الصبار الخام , الكحولي و المائي .
- 2- دراسة تأثير تراكيز مختلفة من هذه المستخلصات في متوسط طول جذور نبات البصل والحصول على التركيز نصف المؤثر %EC50 في متوسط طول الجذور .
- 3- اختيار التراكيز المستعملة في دراسة السمية الوراثية اعتماداً على التركيز نصف المؤثر .
- 4- دراسة تأثير التراكيز المختلفة ولمدد تعريض مختلفة من مستخلصات هلام الصبار في بعض الصفات الخلوية لجذور نبات البصل كدراسة دليل الانقسام المايوتوزي %MI , دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية .
- 5- دراسة السمية الوراثية لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار باستعمال تقانة التضاعف العشوائي متعدد الاشكال للدنا .

Literature Review

2- استعراض المراجع

2-1: تصنيف نبات الصبار

صنف نبات الصبار قديماً ضمن العائلة الزنبقية *Liliacea* اما التصنيف الحديث فيضع الصبار ضمن عائلة *Asphodelaceae* (Encyclopedia of Life (EOL),2013) .

Kingdom : Plantae

Division : Magnolio

Class : Liliopsida

Order : Liliales

Family : Asphodelaceae

Genus : *Aloe*

Species : *vera*



شكل (1): نبات الصبار (Amar and Resham,2008)

ويضم جنس *Aloe* 300 نوعاً ولكن هنالك ثلاثة أنواع من هذا الجنس التي تستعمل كأعشاب طبية بشكل واسع وهي :

1- *Aloe vera* والمعروف بالصبار العادي الذي تكون أوراقه متجمعة وردية الشكل تظهر من سطح التربة على هيئة باقة خنجرية أو رمحية يتراوح طولها بين 20-30 سنتيمتر وعرضها نحو 4-7 سنتيمتر وتكون ذات قمم مدببة جداً وحافتها تحتوي على أشواك مدببة وعندما يكبر النبات في العمر يخرج منه ساق طويلة تصل طولها الى نحو متر او أكثر ويكون في قمته مجموعة من الازهار على شكل عنقود.

2- *Aloe perryi* والمعروف بالصبار الافريقي وهو يشبه النوع العادي خضرياً , إلا إن أوراقه تكون قصيرة ولونها أخضر محمر وتمتاز أزهاره باللون البرتقالي والنورة غير متفرعة.

3- *Aloe ferox* والمعروف باسم الصبار الآسيوي ويتميز هذا النوع بساقه الطويلة التي يصل ارتفاعها الى 3.5 متر اما الورقة فيبلغ طولها 60 سنتيمتر وعرضها 5.3 سنتيمتر ويكون لون السطح العلوي للورقة اخضر غامق . أما السطح السفلي ذو لون أزرق مخضر, وتحتوي حافتها على أشواك رفيعة , والنورة متفرعة ذات أزهار كثيفة بيضاء أو برتقالية اللون (ابو زيد , 1986).

2-2: الصبار (*Aloe vera* L. (*Aloe barbadensis* (Miller)))

ينمو الصبار في براري المناطق المدارية , وعرف منذ آلاف السنين في اليونان و مصر والهند والمكسيك و منطقة البحر الأبيض المتوسط , جنوب أوروبا , ينمو في آسيا , جنوب الولايات المتحدة الأمريكية , برمودا , البهاما و جزر الهند الغربية وهو موجود اليوم في أنحاء العالم كافة . وتعد أهم البلدان المنتجة لهذا النوع هي غينيا , جنوب أفريقيا , غانا , سومطرة وأوغندا (النعيمي , 2010) . أستزرع نبات الصبار في العراق في بداية السبعينيات (Chakaravarty,1976) .

يعد نبات الصبار من النباتات العشبية أو الشجيرية المعمرة التي تعود الى النباتات البذرية (الزهرية) مغطاة البذور, تتميز أوراق الصبار بالسّمك ويختلف طول سيقانها حسب أنواعها المختلفة , تكون اوراقها عريضة سميقة لحمية مخضرة اللون تغطيها بشرة شمعية ذات حواف محاطة بالأشواك , تحيط الأوراق بجذع النبات بشكل حلزوني (النعيمي , 2010) . يمتاز ساق الصبار بكونه قصيراً في السنوات الأولى من عمر النبات وقد يصل ارتفاع النبات الى متر أو أكثر من ذلك بعد سنوات عديدة . أما الازهار فتوجد على هيئة نورة في شمراخ زهري طويل , ولها ألوان مختلفة تتراوح بين الاصفر الى الأحمر الزاهي (أبو زيد , 1986 ; Jyotsana et al., 2009) كما في شكل (1) .

أشتق أسم نبات الصبار *Aloe vera* من الكلمة العربية *Alloeh* التي تعني المادة المرة بينما تعني كلمة *Vera* في اللغة اللاتينية سائل (Amar and Resham, 2008) . وللصبار اسماء شائعة عديدة منها الصبر , الصبر الحقيقي أو الصبير (النعيمي , 2010) .

2-3: المكونات الفعالة

يحتوي نبات الصبار *Aloe vera* على العديد من المكونات الكيميائية المهمة التي تستعمل بشكل واسع في صناعة الادوية وفي علاج العديد من الامراض . توجد اغلب هذه المواد الكيميائية في ورقة نبات الصبار اذ تكون ورقة الصبار عصارية ومحمية بطبقة سمكية من نسيج البشرة الخضراء اللون التي تحيط بطبقة النسيج المتوسط , تحتوي طبقة الدائرة المحيطة على افرازات الورقة الصفراء والمسماة *Aloe sap* او *The exudates* , وهو عبارة عن سائل ذو لون اصفر وطعمه مر يوجد في داخل خلايا الدائرة المحيطة ويخرج تلقائياً عند قطع الاوراق من قاعدتها (Agarry et al.,2006) . يحتوي هذا السائل على العديد من المواد الفعالة و التي تتكون بصورة رئيسة من الفينولات *Phenols* والكونونويدات *Quinonoids* وتساهم هذه المركبات في تكوين المركبات العطرية *Aromatic* (Lawrence,1996) . اما طبقة النسيج المتوسط فتتكون من نسيج كلورنكيمي *Chlorenchyma* ونسيج برنكيمي سميك الجدران *Thick parenchyma* . يشغل النسيج البرنكيمي الجزء الاكبر من حجم الورقة ويحتوي على الهلام الجيلاتيني والمعروف بهلام الصبار *Aloe vera gel* شكل (2), وهو لب الورقة المخاطي *Mucilage* المحصور بين بشرتي الورقة العليا والسفلى وتحتوي هذه الطبقة على اكثر المواد الفعالة للصبار , اذ لها تأثيرات ترطيبية (Agarry et al.,2006) , وهي عبارة عن مادة شفافة و رقيقة تشبه الهلام , يحتوي الهلام على العديد من المواد الفعالة طبياً اذ يكون غنياً بالمواد الكاربوهدراتية والمعادن والفيتامينات . تبلغ نسبة السكريات الاحادية في هلام الصبار 0.6% , فضلاً عن وجود السكريات المتعددة وهي السكريات ذات سلاسل طويلة متكونة من جزيئات الكلوكوز وجزيئات المانوز مرتبطة مع بعضها البعض , ويطلق على جزيئات *Gluc-Mannans* مصطلح *Acemannan* (Strickland, 2001 ; Zhang and Tizard,1996) . ان نسبة السكريات المتعددة في الصبار تصل الى 25% من المجموع الكلي للمواد الصلبة وهي من المكونات المهمة التي يعود لها اغلب الخصائص الطبية لنبات الصبار وهناك ايضاً سكريات متعددة مرتبطة مع البروتينات تسمى *Proteoglycans* او *Glycoproteins* (King et al.,1995) . اذ تساعد هذه البروتينات في تكوين نسيج البشرة *Epidermal tissue* (Choi et al.,2001) .

يحتوي الهلام ايضاً على بعض الاحماض العضوية مثل Lactic acid , Malic acid , Salicylic acid (ملح الحامض) ولهذا الحامض علاقة وثيقة بالاسبرين الذي له القدرة على تثبيط الالتهابات من خلال تثبيط انتاج البروستوكلاندن (Prostaglandin) (Pelley and Wang, 1993). كذلك يحتوي الهلام على الكثير من المعادن Mineral مثل البوتاسيوم Potassium , الكالسيوم Calcium , المنغنيز Manganese المغنيسيوم Magnesium , النحاس Copper و السلينيوم المضادة للاكسدة (Bouchev and Gjerstad, 1994), وكذلك يحتوي الهلام على العديد من الفيتامينات مثل A , B , C , E (Grindley and Reynolds, 1986). ويحتوي الهلام على الانزيمات مثل Bradykininase الذي يعمل على زيادة نفاذية الاوعية الدموية وتقليل الالم والحساسية والاحتقان مما يؤدي الى تقليل الانتفاخ الحاصل في اماكن الالتهابات (Davis, 1985). فضلاً عما تقدم يحتوي الهلام على الستيرويدات (Davis et al., 1992). تكون الصابونيات Saponins 3% من الهلام التي لها القدرة على التطهير (Reynolds and Dweck, 1999 a ; Urch, 1999) كما في جدول(1).



شكل (2): هلام الصبار

(<https://www.minedbp.com/featured/forever-living-products-for-sale.php>)

جدول (1): المواد الفعالة التي يحتوي عليها هلام الصبار

(Hamman, 2008 ; Joseph and Raj ,2010)

B1, B2, B6, Choline, β-carotene, A , B , C , E, Folic acid	فيتامينات Vitamins
Lectins, Lectin-like substances	بروتينات Proteins
Mannan , Acetylated mannan , Glucomannan , Galactan , Cellulose, Pectic substance	سكريات متعددة Polysaccharides
Aloe-emodin, Aloetic-acid, Aloin A and B, Emodin , Chromones	Anthraquinones
Alkaline phosphate, Amylase, Carboxypeptidase, Catalase, Lipase, Bradykininase	انزيمات Enzymes
Mannose, Aldopentose, Glucose, L-rhamnose	سكريات احادية Monosaccharaides

2-4: الاستعمالات الطبية لنبات الصبار

1- استعمال الصبار في علاج الجروح والحروق

اظهرت الدراسات ان نبات الصبار له القدرة على علاج انواع مختلفة من الجروح الجلدية والحروق , اذ يسرع في اصلاح الجروح والحروق (Feily and Namazi, 2009) . ان الصبار يحفز على شفاء الجروح من خلال تحفيزه بشكل مباشر نشاط Macrophage والـ Fibroblasts التي تزيد من مادتي الكولاجين Collagen والبروكولاجين Procollagen ومن ثم يؤدي الى اصلاح النسيج (Yates *et al.*, 1992; Hegggers *et al.*, 1996). استعمل هلام الصبار كذلك في علاج الحروق من الدرجة الثانية (Maenthaisong *et al.*, 2007) , كما يستعمل لعلاج البثور والطفح الجلدي والقرحة (Dold and Cocks, 2000). استعمل ايضاً لحماية الطبقات الخارجية من الجلد بعد حصول الجروح اذ يعد مانعاً لمادة Thromboxane A2 التي تكون مسؤولة عن عملية تلف الانسجة

(Crouch *et al.*, 2006). أظهرت الدراسات بان هلام الصبار يساعد في تحسن التئام الجروح للاشخاص المصابين بمرض السكري (Robert *et al.*, 1979). اشارت العديد من الدراسات ان مستخلص نبات الصبار يحفز نمو الخلايا المولدة للالياف Fibroblast والخلايا الطلائية Epithelial cell وتحفز استجابات Lectin-like في الخلايا المناعية المشاركة في عملية اصلاح الخلايا في منطقة الجروح في الجلد (الشفاء وغلق الجروح) (Arnold *et al.*, 2002). يحفز الصبار على تصنيع الكولاجين Collagen synthesis وفعالية الخلايا المولدة للالياف Fibroblast activity في الجسم وكذلك يعمل كمضاد للالتهابات (Robert *et al.*, 1979; Hegggers *et al.*, 1996; Moon *et al.*, 1999).

2- استعمال الصبار كمضاد للسرطان Anti-cancer

يحتوي الصبار على بعض المواد الكيميائية مثل β carotene germanium , Lectins, Arginine و β carotene التي تعد من اقوى المواد المضادة للسرطان و المحفزه للمناعة , وقد اظهرت الدراسات ان هذه المواد تقوم بتأخير نمو الخلايا السرطانية و زيادة عدد الخلايا من نوع T-4 و T-8 التي تقوم بتدمير الخلايا السرطانية لاسيما سرطان الدم (Amusan *et al.*, 2002). وقد اظهرت الدراسات ان سكر المانوز المشتق من الصبار له فعالية قوية كمضادة للخلايا الورمية في الفئران (Leung *et al.*, 2004). وبينت الدراسات ان مادة Aloe-emodin الموجود في هلام الصبار له نشاط مانع لبعض الاورام السرطانية لدى البشر (Yu *et al.*, 2006). ان نبات الصبار غني بالمواد المضادة للأكسدة التي تقوم بازالة الجذور الحرة وبذلك تمنع حدوث اضرار في الخلايا داخل الجسم (Steenkamp and Stewart, 2007).

3- استعمال الصبار في علاج مرض السكري

اظهرت الدراسات ان مستخلص الصبار يستعمل لعلاج مرض السكري من خلال خفض مستوى السكر و Glycated hemoglobin في الدم (Boudreau, 2006;Panda,2000) . بين (Tanaka and Matsuda, 2006) Ghannam *et al.* (1986) انه عند اعطاء مستخلص الصبار عن طريق الفم للجرذ المصابة بمرض السكري من النوع الاول أدى الى خفض مستوى السكر في الدم فضلاً عن خفض مستوى البلازما و الكوليسترول والدهون الثلاثية و الاحماض الدهنية الحرة والدهون الفوسفاتية وقد لوحظ بانه يؤدي الى رفع مستوى الانسولين . وقد اعطى نتائج مشابهة في علاج مرض السكري من النوع الثاني في الجرذ (Can *et al.*, 2004). يعتقد ان سبب استعمال الصبار لعلاج مرض السكري هو احتوائه

على مادتي Anthraquinones و Mannans (Reynolds and Dweck, 1999 b; Can et al., 2004).

4- استعمال الصبار في علاج امراض الدورة الدموية

اوضح Choi et al. (2002) ان تناول مستخلص الصبار عن طريق الفم يحسن اداء الاوعية الدموية والقلب , اذ استنتج الباحث بأن مادة Beta-sitosterol تعمل على زيادة تعبير عامل نمو الاوعية الدموية (VEGF) Vascular endothelial growth factor . واوضح Ajabnoor (1990) بأن هلام الصبار يساعد في معالجة قزمة البرد Frostbite اذ يزيد اقطار الشعيرات الدموية مما يؤدي الى زيادة الدورة الدموية وذلك عند وضع الهلام مباشرة على الجلد . وقد اثبت Sakai et al. (2006) ان مستخلص الصبار يساعد في إطالة عمر الفئران المعرضة للنزيف الشديد . واوضح Saleem et al. (2001) ان المـــــــواد Aloe-emodin and Aloin A, Elgonica dimer A , Bisbenzopyran المستخلصة من الصبار لها القدرة على خفض الضغط لدى الجرذ .

5- استعمال الصبار في علاج امراض الجهاز الهضمي

اوضحت دراسات عديدة بأن هلام الصبار يستعمل بشكل واسع في علاج العديد من امراض الجهاز الهضمي (Kandil and Gobran, 1982). اذ اظهرت التجارب على الفئران ان مستخلص الصبار يقوم بتقليل افرازات الحوامض المعدية وكذلك توفر حماية للطبقة المخاطية من اضرار حمض الهيدروكلوريك (Mahattanadul, 1996 ; Suvitayavat et al., 2004 ; Yusuf et al., 2004). وقد تبين ايضاً ان الصبار يعالج قرحة المعدة لدى البشر (Kandil and Gobran, 1982) والفئران (Mahattanadul, 1996 ; Suvitayavat et al., 2004) . اذ يعتقد ان البروتينات السكرية Glycoprotein و Aloctin A التي تعد احد مكونات الصبار تمنع تكون القرحة في المعدة التي تتكون بسبب مادة الاندوميتاسين عند اعطائها الى الفئران (Saito et al., 1989). وقد استعمل الصبار كذلك لعلاج امراض التهابات الامعاء (Langmead et al., 2004). ويستعمل مستخلص الصبار طبيياً كمادة ملينة ومسهلة وكذلك يستعمل لتخفيف اضطرابات الجهاز الهضمي في الحيوانات (Hutchings and Robson, 1996) . يتحلل هلام الصبار في القناة الهضمية ليكون Aloe-emodin anthrone التي تتأكسد تلقائياً الى Aloe-emodin و Quinone . ان مادة

Anthraquinones تمتص بشكل قليل من قبل المعدة لذا يتم تحليلها بواسطة البكتريا الموجودة في المعدة وتتحول الى Aloe-emodin التي تكون سهلة الامتصاص من قبل المعدة والمسؤولة عن الخاصية المسهلة للصباء , ويحتوي الصبار على مشتقات 1,8-Dihydroxyanthracene التي لها تأثيرات ملينه للمعدة (Blumenthal *et al.*, 1998).

6- استعمال الصبار كمحفز للجهاز المناعي

يحتوي الصبار على مواد تحفز الاستجابات المناعية اذ يحفز الخلايا البلعمية Macrophages وخلايا الطحال من نوع خلايا تائية T-cell و خلايا بائية B-cell وتحفز هذه الخلايا على انتاج IL-1, INF-, IL-2, IL-6 و TNF-alpha (Leung *et al.*, 2004;) (Sa *et al.*, 2005). بينت الدراسات ان مادة Aloe-emodin المستخلص من اوراق الصبار تزيد مستوى TNF- alpha و Interleukin beta في كريات الدم البيضاء (Yu *et al.*, 2006). استعملت مادة Acemannan المستخلصة من الصبار كمكمل علاجي عند التطعيم ضد بعض الامراض الفايروسية للطيور (Djeraba and Quere, 2000).

2-5: السمية الوراثية Genotoxicity

السمية الوراثية عبارة عن مجموعة من الاعراض السلبية والتغيرات التي تطرأ على الكائن الحي بسبب تعرضه لمادة سامة , وهي اعراض خلوية وراثية Cytogenetic قد تنعكس بطبيعة الحال على انشطة و وظائف الكائن الحي المختلفة (أبو خطوة ,1985) . ويعد الانقسام الخلوي Cellular division مرتعاً خصباً لاكتشاف الكثير من الاختلالات والتغيرات الخلوية الوراثية , التي غالباً مايكون لها تأثير فسيولوجي او مورفولوجي على الكائن الحي (أبو خطوة ,1985) . وتجدر الاشارة الى ان للسمية الوراثية انواعاً متعددة , فقد تظهر في صورة اختلالات او طفرات تؤدي الى تغير كمية او بنية المادة الوراثية (او RNA) وبناء على المستوى الذي تحدث عنده الاختلالات أو الطفرات قسم ستانسفيلد (1969) الطفرات على :

أ – طفرات جينية Gene mutation

وهي تشير الى تغيرات تطراً على تسلسل نيوكليوتيدات لجين معين ضمن مجين الكائن الحي , وتأخذ الطفرات الجينية اشكالاً عديدة منها (الاببدال القاعدي Base substitution , حذف Deletion , اضافة Insertion).

ب . اختلالات كروموسومية Chromosomal aberration

وهي تعبر عن تغيرات تطراً على تركيب او عدد او سلوك الكروموسومات ضمن جينوم الكائن الحي (الغامدي واخرون , 1994) . ومن ضمن صور الاختلالات التي تحدث أثناء الانقسام الميوزي ما يأتي :

1- تغيرات في عدد الكروموسومات Aneuploidy

تؤدي السمية الوراثية الى تغير في عدد الكروموسومات , وهذا التغير قد يكون بالنقص او الزيادة لكروموسوم واحد او اكثر وغالباً ما يحدث نتيجة لتعرض الخلية لعوامل مطفرة تؤدي الى فشل أحد الكروموسومات في التحرك الى أي من قطبي الخلية , مما ينتج معه فقدان الكروموسوم وغيابه من المجموعة الكروموسومية للكائن الحي (الغامدي واخرون , 1994).

2- التوقف الميوزي Mitotic arrest

وقد يحدث أثناء الطور الاستوائي ويعرف باسم C-metaphase او اثناء الطور الانفصالي ويعرف باسم C-anaphase ويحدث بسبب خلل في تكوين خيوط المغزل , ومن ثمّ ينتج عن ذلك توقف الخلية عن الاستمرار في عملية الانقسام عند الطور الاستوائي أو الانفصالي اذ تظهر الكروموسومات على درجة كبيرة من الحلزنة وغير موجهة الى الأقطاب (Dewey and Miller ,1969 ; Vig , 1971).

3- الكروموسومات الحلقية Ring chromosomes

تظهر بعض الكروموسومات على هيئة حلقة دائرية , وهذه الحالة قد تعود الى احتمال حدوث كسرين في نفسه الكروموسوم , مؤدياً الى فقد التيلوميرات الطرفية Telomeric Losses ومن ثم التحام الطرفين كنتيجة لعملية اعادة الالتحام (Rejoining) (Sax , 1940;) (Raghuvanshi and Singh , 1976).

4- الجسور الكروموسومية Chromosome bridges

السبب في ظهور مثل هذه الاختلالات قد يعود الى حدوث تبادل غير متساو او الى حدوث كسر طرفي في الكروموسوم قبل المضاعفة , وينتج عن المضاعفة لهذا الكروموسوم الناقص كروماتيدتين اخويين بأطراف لزجة , واندماج مثل هذه الاطراف يعطي كروماتيدة ثنائية السنتروميير , ونتيجة لحدوث شد للسنتروميير باتجاه القطبين تظهر الجسور الكروموسومية (الغامدي واخرون, 1994) .

5- المغزل الثلاثي والرباعي الاقطاب (Tripolars and tetrapolars)

تظهر مثل هذه الاختلالات في بعض الخلايا نتيجة التغيرات التي تحدث في البيئة الفسيولوجية عند المعاملة ببعض المواد الكيميائية وكذلك لكبت جزئي في نشاط المغزل , وفيها تظهر الكروموسومات منجذبة الى ثلاثة او اربعة أقطاب (Haliem, 1993) .

6- تكون أنوية صغيرة Micronuclei

تنتج هذه الحالة من تكسر Fragmentation الكروموسومات ذات السنتروميير الى شظايا Fragments صغيرة جداً او الى وجود كروموسومات متلكئة Lagging Chromosome تحاط كل منها بغشاء نووي مكوناً نواة صغيرة ويعد ظهور الانوية الصغيرة من اهم المؤشرات على حدوث الطفرة الوراثية لذا فان هنالك اختبار للكشف عن الطفرات الوراثية يعرف باسم اختبار النواة الدقيقة (Micronuclei Test) وهو احد الاختبارات الحيوية المستعملة في الكشف عن السمية الوراثية (Duan et al., 1998) .

7- اللزوجة الكروموسومات Stickiness

تعد هذه الحالة عدم وضوح معالم الكروموسومات وظهورها بشكل متداخل مع بعضها البعض مما يوحي وكأنها كتلة واحدة (Chauhan et al., 1998) .

8- التشتت الكروموسومي Disturbed chromosomes

نلاحظ مثل هذه الحالات خلال الطور الاستوائي مثلاً ويعرف باسم Disturbed metaphase او خلال الطور الانفصالي ويعرف باسم Disturbed anaphase اذ تبدو الكروموسومات في وضع متشتت ومغاير لوضع الكروموسومات في الحالات الطبيعية , وقد وجد ان هذا يعود الى اختلالات في الجهاز المغزلي المسؤول عن تكوين خيوط المغزل (Turkoglu, 2007) .

9- الكروموسوم المتكئ Lagging chromosome

وهو الكروموسوم ذو سنترومير غير نشط , ومن ثمَّ فإن هذا الكروموسوم لا يمتلك القدرة على الاتصال بخيوط المغزل فيظهر خلال الطور الانفصالي في غير موضعه الطبيعي متأخراً (متكلناً) عن بقية المجموعة الكروموسومية في الوضع المغزلي (Turkoglu,2007).

10- الخلايا الثنائية النواة Binucleated cells

تنشأ مثل هذه الحالات من فشل في تكوين الصفيحة الوسطى بين الخليتين البنويتين ومن ثمَّ تظهر الخلية بنواتين (Sharma ,1983).

11- التشابك الكروموسومي Chromosome clumping

يعد سبب حدوثه الى انقباض الكروموسومات (Chromosome contraction) , ونتيجة لذلك يحدث تشابكها (Sharma ,1983).

12- الشظايا الكروموسومية Chromosome fragments

تظهر كنتيجة لانفصال قطع كروموسومية عن الكروموسومات إذ تفشل هذه القطع في التحام بكرموسوم اخر (Lawley and Brookes , 1963).

13- الكروموسومات ذات الشكل النجمي Star chromosomes

في هذه الحالة تظهر المجموعة الكروموسومية بشكل نجمي اثناء الطور الاستوائي او الطور النهائي وذلك نتيجة لاضطراب كامل في المغزل (Amer ,1965).

تشبيط دالة الانقسام Mitotic index

دالة الانقسام هي النسبة المئوية للخلايا المنقسمة , وعادة يكون لكل انقسام خلوي دالته المميزة له , ويعد الانخفاض في دالة الانقسام دلالة على وجود تراجع في متوسط الانقسام نتيجة حدوث اعتلال في مسار الانقسام .

مما سبق يتضح ان الاختلالات الكروموسومية ستؤدي الى ظهور الكروموسومات خلال اطوار الانقسام المختلفة بأشكال ومواقع مختلفة لما يحدث في الحالات الطبيعية ويتضح ذلك عند مقارنتها بالاشكال الكروموسومية وسيرها الطبيعي خلال دورة الانقسام .

2-6: اختبار القمم النامية لنبات البصل *Allium cepa* L.

يعد اختبار القمم النامية لنبات البصل *Allium cepa* L. من النظم الحياتية المهمة والتي تستعمل بشكل كبير للكشف عن السمية الوراثية للعديد من المواد الكيميائية والفيزيائية وكذلك الملوثات البيئية , يعد هذا الاختبار من اقدم الاختبارات او الانظمة التي استعملت لدراسة التشوهات الكروموسومية (Rank, 2003). واثبتت الدراسات ان نتائج استعمال هذا النظام في دراسة السمية الوراثية كان مماثلاً مع نتائج الدراسات التي استعملت الانظمة الحيوانية كاستعمال الفران او استعمال الاحياء المجهرية (Nilan,1978). استعمل Grant (1978) الانظمة النباتية والحيوانية لدراسة السمية الوراثية لثمانية مواد مختلفة فوجد تشابه كبير في درجة التأثيرات الخلوية لهذه المواد في كلا النظامين . اما Nilan (1978) فقد درس التأثيرات السمية لعدد من المبيدات العشبية واستعمل نظامين حياتيين مختلفين (النباتات والحيوانات) فوجد نتائج متشابهة وعلاقة قوية في تكرار التشوهات الكروموسومية في كلا النظامين .

يُعتمد نظام القمم النامية لنبات البصل بسبب بعض المميزات المهمة لهذا النظام منها حساسيته العالية للاختلافات الوراثية فضلاً عن كفاءته في قياس الاختلالات الكروموسومية , الحجم المنتظم لكروموسومات البصل وسهولة العمل معه مختبرياً وحقلياً من حيث سرعة النمو وتكوين عدد كبير من الجذور في وقت قصير (Fiskesj, 1985, 1988; Grant 1992; Rank, 2003 ; Saxena et al., 2005; Konuk et al., 2007; Liman et al., 2011)

استعمل نظام القمم النامية لنبات البصل *Allium cepa* في دراسة السمية الوراثية للعديد من الملوثات البيئية كاستعماله في دراسة السمية الوراثية للمبيدات الحشرية (El-Khodary et al., 1990) , ملوثات التربة كالاسمدة المحتوية على البوتاسيوم (Susan,1997) , المعادن المشعة (Kovalchuk et al., 1998), المعادن الثقيلة (Seth et al.,2008) وبعض ملوثات الماء (Leme and Marin-Morales, 2008) , استعمل هذا النظام وبكفاءة عالية في الكشف عن السمية الوراثية للعديد من النباتات الطبية (Tedesco and Laughinghouse , 2012) كنبات القسط (Qari, 2010) , المستخلص المائي لنبات زنابق المطر البيضاء *Zephyranthes candida* (الانصاري واخرون2010) وكذلك نبات الصبار (İlbas et al., 2012) . فضلاً عن المزايا التي ذكرت لنظام البصل فقد اعطى هذا النظام نتائج جيدة عند استعماله في دراسة السمية الوراثية Genotoxicity على المستوى الجزيئي مقارنة مع الانظمة الاخرى (Szulc et al., 2012). وبشكل عام فان تعرض

المادة الوراثية الدنا للضرر نتيجة لتعرضها للملوثات سيكون على مستوى واحد لجميع الكائنات وذلك لان المواد الوراثية قد تم حفظها بين الاصناف .

2-7: استعمال المؤشرات الجزيئية في دراسة السمية الوراثية

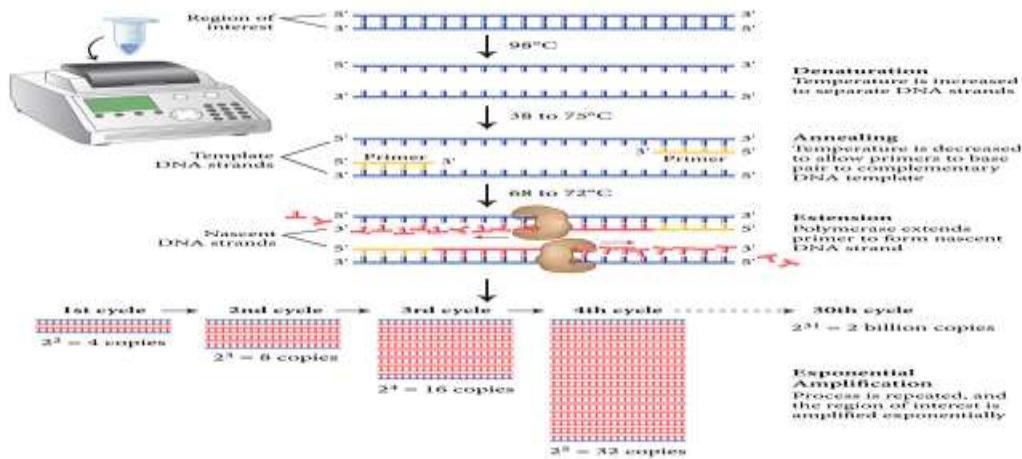
لقد انبثقت فكرة استعمال المؤشرات الوراثية أول مرة في أوائل القرن الماضي من قبل Sax (1932) و Wexelsen (1933) إلا أن تطور أنظمة الترحيل الكهربائي وتقنيات الايزوزايمات (Markert and Moller (1959) ومؤشرات الدنا (Nakamura *et al.* ,) 1987 ; Botstein *et al.*,1980;Williams *et al.*,1990;Welsh and McClelland,1990; Adams *et al.*,1991;Caetano-Anolles *et al.*,1991; Vos *et al.*,1995) قد أدت الى تنامي وتسارع فهم واستيعاب كثير من الباحثين للعلوم الحياتية .

تعرف المؤشرات الجزيئية (مؤشرات الحامض النووي الدنا) بأنها تتابعات خاصة في الدنا يمكن الإستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم أو الجين تستعمل لدراسة العلاقات الوراثية بين الأفراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم (Paterson *et al.*,1991) .

تعد المؤشرات المعتمدة على الدنا الآن من الطرائق الحديثة والمختارة من أجل التمييز بين الكائنات الحية (Baumung *et al.*,2004) , فضلاً عن ذلك فإن استعمال المؤشرات التي تعتمد على الدنا خلق حالة مقارنة فعالة وذلك لكون الإختلافات الجينية قابلة للتتبع والتحقق في كل مراحل تطور الكائن الحي , على العكس من الأنزيمات التي تظهر التغييرات خلال المراحل العمرية المختلفة .

نتيجة لمميزات هذه المؤشرات ومجالات تطبيقاتها الواسعة وبسبب التطور السريع في مجالات علم الأحياء الجزيئي فقد تم استحداث وإيجاد العديد من أنواع مؤشرات الحامض النووي الدنا وحالياً يتركز الانتباه على الطرائق المعتمدة على تفاعل تضاعف سلسلة الدنا PCR . تكمن أهمية تفاعل التضاعف التسلسلي PCR بتفرده بعدة مميزات كالدقة والحساسية العالية في الكشف عن قطعة الدنا معينة ضمن الآلاف من القطع لذلك أصبحت من الصعب الاستغناء عنها في دراسات الوراثة الجزيئية . لقد أصبح لهذا التفاعل تطبيقات واسعة منها دراسة التنوع الوراثي (Nagaoka and Ogiyara,1997) . في نهاية القرن المنصرم وبعد الدراسات المستفيضة لعملية تضاعف الحوامض النووية (دنا) أمكن محاكاة عملية التضاعف خارج الانظمة الحية ولكن مع بعض الاختلافات لتظهر تفاعلات البلمرة PCR التي كانت بجهود

Kary Bank Mullis وفريق بحثه (Mullis and Fallona,1987). حدث على مدى السنين القليلة الماضية ثورة في علم الاحياء الجزيئية بواسطة تقانة مكنت من التضخيم الانتخابي لتتابعات الدنا تعرف هذه التقانة باسم سلسلة تفاعل إنزيم البلمر (PCR) ويمكن تعريف تفاعلات البلمرة على انها تضخيم Amplification اي عمل نسخ كثيرة من اجزاء معينة من جزيئة الدنا خارج الانظمة الحية بمقياس تزايدي لوغارتمي . اذ تتكون من سلسلة من الاحداث تبدأ بـ Denaturation اذ يتحول فيه شريط الحامض النووي الدنا المزدوج إلى أشطرة مفردة باستعمال درجات الحرارة العالية من 94-95 م° ثم يتم خفض درجات الحرارة بسرعة الى 37-65 م° لتقوية قدرة البادئات Primers على الارتباط بأشطرة الحامض النووي الدنا المفردة عند الطرف 3-ends (Annealing) بعد ذلك يتم رفع درجات الحرارة مرة اخرى الى 70-75 م° ليمتد الحامض النووي الدنا (Extension) بوجود انزيم Polymerase والنيوكليوتيدات الاربع المكونة للدنا (dNTPs) اذ يتم تكرار خطوات التسخين والتقوية للحامض النووي عدة مرات متتالية حتى نحصل في النهاية على Unit length double stranded وذلك باستعمال جهاز التدوير الحراري يقوم بتغيير درجات الحرارة دورياً ليتم تفاعل الـ PCR ويعرف هذا الجهاز باسم جهاز التدوير الحراري Thermal cycler (Nagaoka and Ogiyara,1997) كما في شكل (2).



شكل (2): خطوات تفاعل PCR

(<http://www.slideshare.net/MetheeSri/principle-of-pcr>)

ومن اهم تطبيقات سلسلة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR هو التضخيم العشوائي للحامض النووي المتعدد الاشكال للدنا (RAPD) Randomly Amplified Polymorphic . تعرف تقانة الـ RAPD على انها مضاعفة مواقع معينة من الدنا باستعمال بادئ واحد عشوائي

وبوجود انزيم الدنا Polymerase ودرجة حرارة مناسبة لكي تنتج حزماً متضاعفه متعددة ذات اوزان جزيئية مختلفة (Williams *et al.*, 1990). يعد Welsh and Mc-Clelland هما اول من عرف هذه التقنية في عام 1990 باستعمال تقنية PCR في تضخيم قطعة الدنا عشوائية وغير معروفة التسلسل وبمساعدة بادئات متشابهه طولها مكون من 8-10 زوج قاعد . واعتماداً على مواقع الارتباط التي يجدها البادئ المستعمل مع دنا والبعد بين هذه المواقع ينتج التباين في عدد احجام الحزم المتضاعفة الناتجة من عملية التضاعف وان هذا التباين ينتج طبيعياً من الاتحادات الجديدة اثناء الانقسام الخلوي او عن طريق انواع مختلفة من الطفرات , وان أي تغير يحصل حتى لو كان على مستوى قاعدة واحدة بالحذف او الاضافة أو التبديل قد تسبب اكتساب أو فقدان موقع ارتباط للبادئ مما يؤدي الى ظهور أو حذف حزمة في تقنية الـRAPD (Weigand *et al.*, 1993 ; Williams *et al.*, 1990) .

تمتاز البادئات التي تستعمل في تقنية الـRAPD بأنها عشوائية, قصيره, ويمكن تصميمها مخبرياً, ويكون طولها لايتجاوز 12 قاعدة وتكون غنية بمحتواها من القواعد السايوتوكين C و الكوانين G اذ تشكل نسبة 60-70% وذلك لكي يكون ارتباطها بالدنا القالب مستقراً كذلك تمتاز بأنها بادئات عامة Universal غير متخصصة بكائن معين مما يجعلها من الممكن استعمالها مع مختلف الكائنات الحية مثل الانسان والحيوان والنبات والفطريات والبكتريا ويتراوح عدد الحزم الناتجة باستعمال بادئات تقنية الـRAPD بين 1-10 حزم او اكثر في بعض الحالات وتوصف هذه المؤشرات بأنها ذات سيادة تامة وذلك لكونها لا تميز الاليلات المتماثلة عن غير المتماثلة (Winter and Kahl, 1995 ; Williams *et al.*, 1990) كذلك تمتاز مؤشرات RAPD فضلاً عن السهولة والسرعة بكثرة عدد التباينات الناتجة وعدم الحاجة الى كميات كبيرة من الدنا اذ ان 100 نانوغرام تكفي للتفاعل الواحد وكذلك عدم الحاجة الى دنا بنقاوة عالية ولا الى معرفة مسبقة بالتتابعات النيوكليوتيديه للدنا الهدف ودقة النتائج وسهولة الكشف عنها وذلك بترجيلها على هلام الاكاروز وتصبيغها بصبغة بروميد الاثيديوم وتعرضها للاشعة فوق البنفسجية (Williams *et al.*, 1993; Harding *et al.*, 1992).

لقد استعملت هذه التقنية في عمل البصمة الوراثية في أنواع كثيرة من الأحياء الدقيقة وفي الانسان و تعد هذه التقنية واسعة الاستعمال في دراسة القرابة الوراثية وايجاد التباينات الوراثية بين ضمن النوع والعشيرة ورسم الخرائط الوراثية وقد تم تشخيص الأصناف التابعة لكثير من الأنواع النباتية كالقرنابيب (Hu and Quiros , 1991) والكاكاو (Wild *et al.*, 1992)

والفلفل (Prince *et al.*, 1995), كما استعمل (Rady (2001) طريقة الـRAPD مع طرائق AFLP وSSR لتحديد البصمة الوراثية لأصناف الذرة الشامية *Zea mays L.*, الذرة البيضاء (*Sorghum*) (Dahlberg *et al.*, 2002), والبطاطا (الحسني و جلادت, 2006) الرمان (الشاوش وآخرون, 2007), الشعير (Al-Hadeithi, 2012).

استعملت هذه التقنية لدراسة السمية الوراثية التي يسببها العديد من الملوثات البيئية فقد استعملت في دراسة تأثير المبيد العشبي Atrazine على جذور نبات ذرة الشامية اذ استعمل اثنا عشر بادئاً لهذا الغرض (الغيثار, 2007). كذلك في دراسة السمية الوراثية للمستخلص المائي لاوراق نبات الحرمل (*Rhazya stricta* (Decne) باستعمال ثلاثة بادئات واطهرت النتائج ان هذا المستخلص له تأثير مطفر في مستوى الدنا (Baeshin *et al.*, 2009). واستعملت هذه التقنية ايضاً في الكشف عن التلوث البيئي بمادة الكاربوفينرون بعد تعريض جذور نبات البصل بتركيز مختلفة من هذا المبيد باستعمال ستة بادئات اذ اظهرت النتائج ان هذا المبيد له تأثير سام وراثياً (Qari, 2009). استعملت هذه التقنية ايضاً في دراسة قام بها Qari (2010) لمعرفة السمية الوراثية التي قد يسببها المستخلص المائي لنبات القسط العربي على جذور نبات البصل اذ استعمل اربعة بادئات عشوائية وبينت النتائج ان نبات القسط العربي *Costus Speciosus* ليس له تأثير سمي في جذور نبات البصل اذ انه لم يسبب اي تغيير في انماط RAPD مقارنة بمعاملة السيطرة, وبين الباحث ان مستخلص نبات القسط العربي يعد مانع للطفرات التي قد تلحق بالجهاز الوراثي للكائن. اشار Szulc *et al.*, (2012) الى نجاح استعمال هذه التقنية للكشف عن السمية الوراثية التي قد تسببها مياه الصرف الصحي للمستشفيات في بولندا التي تحتوي على العديد من الملوثات. واستعملت هذه التقنية للكشف عن السمية الوراثية التي قد تسببها مياه الحنفية باستعمال خمسة بادئات اذ اظهرت النتائج ظهور سبعة عشر حزمة (17) جديدة فضلاً عن اختفاء ثمانية عشرة (18) حزمة في دنا القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة الى تراكيز متزايد من مياه الحنفية في نيجيريا, وازداد ظهور واختفاء الحزم بزيادة التراكيز مما يشير الى قابلية مياه الحنفية في نيجيريا الى احداث اضرار في دنا الكائن الحي (Olorunfemi *et al.*, 2014). وكذلك للكشف عن السمية الوراثية للمستخلص المائي لنبات *Thermopsis turcica* باستعمال اربعة عشر بادئاً اذ اظهرت النتائج ان المستخلص المائي لهذا النبات له تأثير سمي وراثي على القمم النامية لجذور نبات البصل (Ciğerci *et al.*, 2015).

Materials and

المواد وطرائق العمل

Methods

1-3: الأجهزة والمواد الكيميائية المستعملة

1-1-3 : الأجهزة المستعملة

جدول (2): الأجهزة المستعملة في الدراسة

الشركة	الجهاز	ت
Srtorius	Sensitive balance	1 ميزان حساس
Gallenkamp	Autoclave	2 الموصدة
Vision	Shaking water bath	3 حمام مائي هزاز
GFL	Water distiller	4 جهاز تقطير
Eppendorf	Centrifuge	5 جهاز الطرد المركزي
Gallen Comp.	Shaker	6 هزاز كهربائي
Bioneer	جهاز ترحيل كهربائي مع مجهز فولتية Gel electrophoresis unit	7
Bionex	Vortex	8 رجاج
BDH	Nanodrope	9 جهاز قياس الكثافة الضوئية

Inolab	pH meter	جهاز قياس الرقم الهيدروجيني	10
Elettrofor	Gel documentation	جهاز تصوير الهلام	11
Eppendorf	Micropipettes	ماصات دقيقة	12
Memmert	Incubator	حاضنة	13
Tc(4000)Techne	Thermo cycler machine	جهاز التدوير حراري	14
Memmert	Oven	فرن كهربائي	15
Biosan	Hot plate magnetic stirrer	صفحة حرارية ممغنطة	16
Geprufle Sicherhiet (G.S)	Laminar air flow hood	جهاز تعقيم الهواء	17
Olympus	Compound microscope	مجهر ضوئي مركب	18

3-1-2: المواد الكيميائية المستعملة

الشركة	المادة الكيميائية	ت
BDH	Absolute ethyl alcohol	كحول ايثيلي مطلق
Mupid-one	Agarose	الكاروز
Bioneer	Ammonium acetate	خلات الامونيوم
BDH	Gleasial Acetic acid	حامض الخليك الثلجي
Promega	Chloroform	كلورفورم
SCRC	Cetyl trimethyl ammonium bromide	محلول الاستخلاص CTAB
BDH	Isoamyl alcohol	ايزواميل الكحول
GCC	Isopropanol	ايزوبروبانول
Bioneer	Sodium Chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم

Bioneer	Sodium hydroxide (NaOH)	هيدروكسيد الصوديوم	10
Bioneer	Tris_acid	ترس حامضي	11
Bioneer	Tris – base	ترس قاعدي	12
Bioneer	TBE_ buffer	محلول الترحيل	13
Bioneer	Loading dye (Bromophenol blue)	صبغة التحميل	14
Bioneer	Ethidium bromide	بروميد الاثيديوم	15
SCRC	Ethylendiaminetetraaceticacid	EDTA	16
SCRC	Polyvinylpyrrolidone	PVP	17
محلي	Liquid nitrogen	النتروجين السائل	18

جدول (3) : المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة.

2-3: مصادر نبات الصبار *Aloe vera L.*

جمعت اوراق الصبار بأطوال تتراوح بين 30-60 سنتيمتر من الحديقة النباتية التابعة لكلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم / جامعة بغداد , صنف النبات من قبل الاستاذ الدكتورة عذية ناهي سليمان المشهداني استاذ تصنيف النبات في كلية التربية للعلوم الصرفة- ابن الهيثم / جامعة بغداد

3-3 : مصادر نبات البصل *Allium cepa L.*

استعمل البصل الابيض *Allium cepa L.* وباحجام متوسطة كنظام حياتي في دراسة التأثيرات السمية الوراثية لمستخلصات هلام الصبار . وحصل عليها من هيئة فحص وتصديق البذور التابعة لوزارة الزراعة .

4-3: تحضير مستخلصات هلام الصبار

3-4-1: المستخلص الخام لهلام الصبار

حصل على المستخلص الخام لهلام الصبار من الاوراق بحسب طريقة İlbas *et al.* (2012) وعلى النحو الآتي

جمعت اوراق الصبار وغسلت بوساطة الماء المقطر ثم جففت وقطعت بشكل طولي الى نصفين متساويين و بعدها استخراج الهلام بوساطة ملعقة طعام ومن ثم وضع الهلام في خلاط كهربائي لمدة دقيقة واحدة ثم رشح بوساطة ثماني طبقات من الشاش . حضرت التراكيز المطلوبة بخلطها مباشرة مع الماء المقطر وحسب التركيز المطلوب (حجم / حجم) .

3-4-2: المستخلص المائي و الكحولي لهلام الصبار

جمع 400 غرام من الهلام الخام كما في الخطوة السابقة (3-4-1) ثم خلط الهلام الخام مع 100مليتر من الماء المقطر(مستخلص مائي) او 100 مليتر من الايثيلي 70% Ethanol(مستخلص كحولي) (وزن /حجم) باستعمال خلاط كهربائي لمدة دقيقة واحدة . ترك المزيج لمدة 12 ساعة مع التحريك المستمر باستعمال هزاز كهربائي , ثم وضع في الحاضنه بدرجة 37 °م حتى يجف تماماً ويصبح مسحوقاً جافاً . يتم جمع المسحوق و خزن في الثلاجة لحين الاستعمال .

3-5 : ايجاد التركيز نصف المؤثر %EC50

يعرف التركيز نصف المؤثر (EC50%) Effective concentration بالتركيز الذي يؤدي الى تثبيط متوسط طول الجذور الى 50% (Rank, 2003). واجري الاختبار اعتماداً على Rank (2003).

نميت البصلات في الماء المقطر بدرجة حرارة الغرفة 20-22 °م لمدة 24 ساعة وبواقع 15 ساعة في الضوء و 9 ساعات في الظلام . نقلت البصلات النامية بشكل جيد وباطوال جذور متجانسة الى قناني تحتوي على تراكيز مختلفة من مستخلص الخام لهلام الصبار 5% , 10% , 20% , 30% و 40% و المستخلص الكحولي لهلام الصبار 5% , 10% , 20% , 30% و 50% والمستخلص المائي لهلام الصبار 25% , 50% , 100% , 150% و 200% وبواقع ست بصلات لكل معاملة فضلاً عن ستة بصلات نامية في الماء المقطر كمعاملة سيطرة . تركت العينات لمدة 96 ساعة مع مراعات تبديل المحاليل لكل معاملة

بمحاليل محضرة حديثاً كل 24 ساعة . بعد انتهاء فترة الحضانة اختير افضل 25 جذر نامي من كل بصلة لكل معاملة و قيس متوسط طول الجذور لكل معاملة (Rank,2003).

اعتماداً على نتائج التركيز نصف المؤثر EC50% اختيرت التراكيز اللآتية من مستخلص الخام لهلام الصبار وهي 2% , 5% , 10% , 20% و 40% والتراكيز 5% , 10% , 20% , 30% و 50% من المستخلص الكحولي والتراكيز 25% , 50% , 100% , 150% و 200% من المستخلص المائي لغرض دراسة تأثيرها الخلوي والوراثي في جذور نبات البصل *Allium capa* .

3-6: دراسات الوراثة الخلوية

3-6-1: المحاليل المستعملة في الدراسة الخلوية

1- صبغة الاورسين Aceto orcein stain

حضرت الصبغة من خلال وضع 22.5 مليلتر من حامض الخليك الثلجي واكمل الحجم الى 50 مليلتر من الماء المقطر وسخن المزيج على النار الى درجة الغليان ثم وضع 1 غرام من صبغة الاورسين . خلط المزيج لمدة ساعة من خلال وضعه على Magnetic mixer, بعدها رشحت الصبغة بوساطة اوراق الترشيح (Whatman filter paper 8µm) و حفظت في قناني داكنة في الثلاجة (Chandraker *etal.*, 2014).

2- محلول التثبيت Fixation solution

حضر محلول التثبيت بمزج ثلاثة احجام من كحول الايثيلي المطلق الى حجم واحد من حامض الخليك الثلجي (Rank,2003).

3-6-2: معاملة جذور نبات البصل بمستخلصات هلام الصبار

اختيرت البصلات باحجام متماثلة وازيلت الجذور الميتة من القاعدة ووضعت في قناني تحتوي على الماء المقطر مع مراعاة تغطيس قاعدة البصلة بالماء بشكل جيد وتركت لمدة 24 ساعة وعند درجة حرارة 20-22 م (Rank,2003).

نقلت البصلات النامية بشكل جيد وذات جذور متجانسة وبطول 1-1.5 سنتيمتر تقريباً الى قناني تحتوي تراكيز مختلفة من مستخلص الهلام الخام 2% , 5% , 10% , 20% و 40% ومن المستخلص الكحولي 5% , 10% , 20% , 30% و 50% ومن المستخلص المائي 25% , 50% , 100% , 150% و 200% . وتركت لثلاث مدد

تعريض 24, 48, و72 ساعة وبواقع ثلاث بصلات لكل تركيز ولكل مدة تعريض من كل مستخلص فضلاً عن ثلاث بصلات كعامل سيطرة مع مراعاة وجود معاملة سيطرة لكل مدة تعريض . جمع 30 جذراً من كل معاملة بعد 24, 48, و 72 ساعة لأجل فحصها خلويًا (Rank,2003).

3-6-3: التثبيت والحفظ

نقلت الجذور المعاملة بالمستخلصات الثلاثة وبالمدد الزمنية المختلفة الى المحلول المثبت وتركت لمدة 24 ساعة ثم غسلت الجذور في 70% كحول اثيلي مرتين بواقع ساعة لكل مرة ثم غسلت بالماء المقطر لمدة دقيقة واحدة قبيل التصيبغ (Rank,2003).

3-6-4: الفحص الخلوي

غمست الجذور قبل الفحص بمحلول حامض الهيدروكلوريك المركز HCl(1N) ووضعت في الحمام المائي تحت درجة حرارة 60 °م لمدة 15 دقيقة وذلك لتطرية الجذور , وبعد المعاملة بحامض الهيدروكلوريك يتم وضع الجذور على شريحة زجاجية نظيفة ويتم التخلص من الاجزاء الزائدة من الجذر وابقيت القمة النامية Root tip فقط . وضعت قطرتان من الصبغة فوق القمة النامية وتركت لمدة دقيقتين ووضع غطاء الشريحة وضغط بخفة بوساطة الابهام لكي يتم التخلص من الصبغة الزائدة وفرشت الخلايا باستعمال مؤخرة قلم الرصاص ثم فحصت مباشرةً بوساطة المجهر الضوئي المركب نوع Olympus compound microscope (Rank,2003).

فحصت 1000 خلية تقريباً لكل شريحة ومن مواقع مختلفة في الشريحة , وكان مجموع الخلايا التي فحصت لكل تركيز وبالمدة الزمنية الواحدة 5000 خلية . سجلت أعداد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة والقيم النسبية لاطوار الانقسام المختلفة والخلايا المحتوية على اختلافات كروموسومية وشواذ الميتوزية و صورت باستعمال Omaxa camera.

3-6-5 : تحليل نتائج دراسة الوراثة الخلوية

استعمل اختبار One Way Anova باستعمال برنامج SPSS V. 15 . في تحليل نتائج دليل الطور , دليل اطوار الانقسام و النسبة المئوية للتشوهات.

و حسب دليل الانقسام الميتوزي Mitotic Index بحسب (Becker, 1986) وكالاتي :

دليل الانقسام الميوزي = (عدد الخلايا المنقسمة / العدد الكلي للخلايا المنقسمة وغير المنقسمة) * 100

وحسبت نسبة الاطوار الانقسامية (Frequency of mitotic phases) بحسب (Becker, 1986) وكالاتي :

نسبة الاطوار الانقسامية = (عدد الخلايا ل احد الاطوار / العدد الكلي للخلايا المنقسمة) * 100

وحسبت نسبة الشذوذ الكروموسومي بحسب (Becker, 1986) وكالاتي :

نسبة الشذوذ الكروموسومي = (عدد الخلايا الشاذة لجميع انواع الشذوذ الكروموسومي / عدد الخلايا المنقسمة الكلي) * 100 .

7-3 : الدراسة الجزئية

3-7-1: تعريض جذور نبات البصل لمستخلصات هلام الصبار

وضعت البصلات في الماء المقطر لمدة 24 ساعة واختيرت 50 بصلة نامية بشكل جيد وذات جذور بطول 1-1.5 سنتيمتر تقريباً , نقلت الى قناني حاوية على مستخلص الهلام الخام او المائي او الكحولي وبالتراكيز المذكوره في الفقرة (3-6-2) وتركت لمدة اسبوع ثم جمعت الجذور المعرضة للمستخلصات وحفظت بدرجة حرارة -20 م° لحين الاستعمال.

3-7-2 : المحاليل المستعملة في استخلاص الدنا

1- محلول الاستخلاص Extraction buffer

حضر محلول استخلاص الدنا و بحسب طريقة (Tai and Tanksley 1999) , عقت المواد بالمؤصده (15 بار لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 120 م°).

ت	المادة	التركيز
1	كلوريد الصوديوم Sodium chloride (NaCl)	1.4 مولر
2	ترس حامضي Tris – HCl , pH 8	0.1 مولر

20 ملي مولر	Ethylendiaminetetraaceticacid	EDTA	3
2%	Cetyl trimethylammoniumbromide	CTAB	4
1%	Polyvinyl pyrrolidone	PVP	5
1%	β-mercaptoethanol	بيتا ميركابنتو ايثانول	6

2- محلول كلور فورم / كحول الايزواميل Chloroform / Iso amyl alcohol solution

حضر محلول الكلور فورم / ايزواميل بنسبة 24 حجم من الكلور فورم : حجم واحد من كحول الايزواميل وحفظ هذا المحلول في قنينة معتمة ومحكمة عند درجة حرارة 4⁰ م.

3- محلول الغسل Washing buffer

ت	المادة	التركيز
1	خلات الامونيوم	Ammonium acetate 10 ملي مولر
2	الايثيلي	Ethanol 76%

4- TE buffer

حضر المحلول باذابة المواد الموضحة ادناه في الماء المقطر و عقم بالمؤصدة (15 بار لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 120⁰ م).

ت	المادة	التركيز / ملي مولر
1	ترس قاعدي	Tris – base 10
2	Ethylendiaminetetraacetic acid , pH : 8 (EDTA)	1

3-7-3: استخلاص الدنا

استخلص الدنا من جذور البصل النامية لمدة اسبوع في تراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار الخام , الكحولي و المائي وبالاعتماد على طريقة الاستخلاص المعتمدة على استعمال مادة (CTAB) وذلك وبحسب طريقة (Tai and Tanksley 1999).

استخلص الدنا وفق الخطوات الاتية :-

1. طحن 2-3 غرام من جذور نبات البصل في هاون خزفي بعد اضافة كمية مناسبة من النتروجين السائل حتى تصبح الجذور على شكل مسحوق ابيض ناعم .
2. وضع المسحوق في انابيب سعة 50 مليلتر و اُضف لكل عينة 10 مليلتر من محلول الاستخلاص Extraction buffer الذي سخن بدرجة حرارة 65 °م مسبقاً و حضنت في حمام مائي بدرجة حرارة محلول الاستخلاص نفسها لمدة 60 - 90 دقيقة مع التحريك كل 30 دقيقة .
3. بعد انتهاء مدة الحضان تركت الانابيب لمدة 5 دقائق في درجة 22± °م ثم اُضف الى كل انبوب 6 مليلتر من محلول الكلوروفورم - ايزواميل مع التحريك المستمر بهدوء ولمدة 15 دقيقة .
4. وضعت العينات بجهاز الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة وبدرجة حرارة الغرفة .
5. عزلت الطبقة المائية العليا و نقلت الى انبوبة جديدة ثم اُضيف اليها حجم مساوٍ من مادة الايزوبروبانول المبرد Ice cold isopropanol لكل عينة و مزجت جيداً بالتقليب بهدوء الى ان تظهر خيوط الدنا او تظهر بشكل كتلة بيضاء تمثل خيوطا الدنا .
6. نقلت خيوط الدنا باستعمال كلاب زجاجي الى انبوبة جديدة و اُضيف اليها 1 مليلتر من محلول الغسل Washing buffer و تركت لمدة 20 دقيقة ثم توضع في جهاز النبد المركزي بسرعة 4000 دور/دقيقة لمدة 10 دقائق لغرض ترسيب الدنا .
7. تخلص من محلول الغسل وذلك بقلب الانابيب على ورق الترشيح لمدة 10-15 دقيقة للتخلص نهائياً من محلول الغسل . بعدها وضع 300 مايكروليتر من محلول الاذابة TE bufeer و تركت الى اليوم اللآتي في درجة حرارة الغرفة لاتمام عملية اذابة الدنا ثم حفظت في درجة حرارة 20- °م لحين الاستعمال .

3-7-4: قياس تركيز الدنا وتقدير نقاوته

- قياس تركيز الدنا من خلال قياس بوساطة جهاز الـ Nanodrop و تراوحت نقاوة الدنا 1.7-1.9 و بتركيز (500-2000) نانوغرام/مايكروليتر .

يتم تقدير نوعية الدنا من خلال ترحيل عينة منه على هلام الاكاروز بتركيز 1% وذلك بالتوازي مع مؤشر الحجم الجزيئي Ladder اذ يتألف من 13 شريطاً مزدوجاً لقطع الدنا التي تعود لاجسام من 100-2000 زوج قاعدة.

3-7-5: الترحيل الكهربائي لعينات الدنا على هلام الاكاروز

3-7-5-1: المحاليل المستعملة في ترحيل الدنا على هلام الاكاروز

أ- محلول TBE (Tris – Boric acid – EDTA) بقوة $10\times$ مجهز من شركة Bioneer ويحتوي 1X على المواد الآتية :-

ت	المادة	التركيز/ مولر
1	ترس قاعدي Tris – base	0.89
2	حامض البوريك Boric acid	0.89
3	EDTA Ethylendiaminetetraacetic acid	0.02
4	ماء مقطر Distilled water	

ب - محلول التحميل Loading buffer بقوة $6\times$. والمجهز من شركة Bioneer ويحتوي على المواد الآتية :-

ت	المادة	التركيز
1	صبغة بروموفينول الزرقاء Bromophenol blue	0.25 غرام
2	كليسول Glycerol	50 مليلتر

ج - صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium bromide مجهز من شركة Bioneer بتركيز 10ملغرام/مليلتر واستعمل بتركيز 0.5 مايكروغرام/مليلتر.

3-7-5-2: الترحيل الكهربائي لعينات الدنا على هلام الاكاروز

1. ذوب 1.5 غرام من الاكاروز في 100مليلتر من محلول TBE وذلك لتحضير هلام الاكاروز ذي تركيز 1.5%.

2. سخن المزيج مع التحريك المستمر لحين اكتمال الاذابة ثم يترك الى ان يبرد بدرجة حرارة تقارب 50-55 م° بعدها اضيف 2 مايكروليتر من الاثيديوم برومايد الى المزيج .

3. سكب برفق وبشكل مستمر داخل لوح التحميل لمنع حدوث فقاعات وزيلت ان وجدت.
4. بعد تصلب الهلام وضع لوح التحميل داخل حوض الترحيل ويغمر بمحلول $1 \times$ TBE ثم رفع المشط بهدوء.
5. تمزج عينة الدنا مع محلول التحميل Loading buffer وبنسبة 3/1.
6. حملت العينات داخل الحفر ويراعى عدم خروج العينة من سطح الحفرة و ثم حمل الدليل الحجمي .
7. وصلت اقطاب التيار الكهربائي ويجهز بقدرة من 1- 3 فولت / سم.
8. اوقفت الترحيل عند وصول محلول التحميل الازرق اللون الى ما قبل نهاية الهلام.
9. فحص الهلام بوضعه على جهاز الاشعة فوق البنفسجية UV Transluminater عند الطول الموجي 260 نانوميتراً لرؤية حزم الدنا وقدر حجمه الجزيئي بالمقارنة مع الدليل الحجمي ثم صور باستعمال كاميرا Nikon D600.

3-7-6: تحضير تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة الدنا

Random amplified polymorphic (RAPD)

اعد هذا التفاعل حسب ما ورد في طريقة (Williams *et al.* (1990) وتوصيات الشركات المجهزة لمواد التفاعل مع بعض التحويرات .

3-7-6-1: المواد والمحاليل اللازمة لاجراء تفاعلات RAPD

أ- Master mix جهاز من شركة Bioneer ويحتوي على المواد الآتية :-

ت	المادة	حجم 20 uL للتفاعل
1	أنزيم بلمره دنا Top polymerase	1 U
2	قواعد نايتروجينية dNTPs(dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	250 ملي مولر
3	ترس حامضي Tris-HCl, pH=9	10 ملي مولر

4	كلوريد البوتاسيوم	KCl	30 ملي مولر
5	ثنائي كلوريد المغنيسيوم	MgCl ₂	1.5 ملي مولر
6	صبغة مثبتة	Stabilizer and tracking dye	—

ب- البوادئ العشوائية Primers جهازه البوادئ من قبل من شركة Alpha الكندية والموضحة في الجدول (4) التي تم اختيارها بحسب (Hassan and Yassein 2014).

جدول (4) البوادئ العشوائية المستعملة مع تتابعاتها

ت	اسم البادئ	تتابع البادئ 5' — 3'
1	OPA-01	5' - CAGGCCCTTC-3'
2	OPA-02	5' -TGCCGAGCTG-3'
3	OPA-03	5' -AGTCAGCCAC-3'
4	OPA-04	5' -AATCGGGCTC-3'
5	OPA-05	5' -AGGGGTCTTG-3'
6	OPA-06	5' -GGTCCCTGAC-3'
7	OPA-07	5' -GAAACGGGTG-3'
8	OPA-08	5' -GTGACGTAGG-3'
9	OPA-09	5' -GGGTAACGCC-3'
10	OPA-10	5' -GTGATCGCAG-3'

3-6-7-2: طريقة عمل تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا (RAPD)

يستحسن العمل داخل جهاز تعقيم الهواء الطبقي Laminme flow اي العمل في ظروف معقمة ويجب ان تكون المحاليل جميعها محفوظة على الثلج .

ت	المادة	التركيز النهائي	الحجم لعينة واحدة /مايكروايلتر
---	--------	-----------------	--------------------------------

5	1 ×	Bioneer master mix	1
2	10 pmol	البادئ العشوائي Primer	2
5	100 ng /ml	عينه الدنا	3
13	—	ماء مقطر معقم	4

حضر خليط تفاعل PCR والمتكون من المواد اللاتية :

اذ يكون الحجم النهائي لكل انبوبة 20 مايكروليتر ثم نبذ لعدة ثواني و وضعت الانابيب في جهاز التدوير الحراري وينفذ البرنامج اللآتي :

عدد الدورات	المدة الزمنية / دقيقة	درجة الحرارة / م.	ت
دورة واحدة	5	Initial denaturation 94	1
40 دورة	1	Denaturation 94	2
	1	Annealing 36	3
	2	Extension 72	4
دورة واحدة	10	Final extension 72	5

رفعت الانابيب من جهاز التدوير الحراري وأجري ترحيل المزيج على هلام الاكاروز بتركيز 1.5% مع صبغة الاثيديوم برومايد وبفولتيية 5 فولت / سنتيمتر مع مؤشر الدليل الحجمي ولمدة ساعتين . فحص تحت الاشعة فوق البنفسجية UV light وصور بواسطة كاميرا Nikon D 600 .

7-7-3: تحليل نتائج الدراسة الوراثية

- 1- أحصيت البيانات الناتجة من مضاعفة مواقع RAPD بإعطاء الرمز (1) لوجود الحزمة و(0) لعدم وجودها باستعمال برنامج GelQuant v.1.4 و بناءً لذلك رسمت شجرة القرابة بين العينات المدروسة لمؤشرات RAPD وفق معامل (Jaccard) للتشابه الوراثي و باستعمال برنامج Past v.1.91 (Hammer *et al.*, 2001) .
- 2- قيست نسبة الاستقرار الجيني (GTS%) Genomic template stability بالقانون الآتي (Atienzar *et al.*, 1999) :

$$GTS \% = (1 - a / n) \times 100$$

a = عدد الحزم المتعددة الأشكال (Polymorphic) للبيادئ

n = عدد الحزم الكلي لمعاملة السيطرة عند البيادئ نفسه

Results and Discussion

4- النتائج والمناقشة

4-1- النتائج

4-1-1- تأثير مستخلصات هلام الصبار في متوسط طول جذور نبات البصل

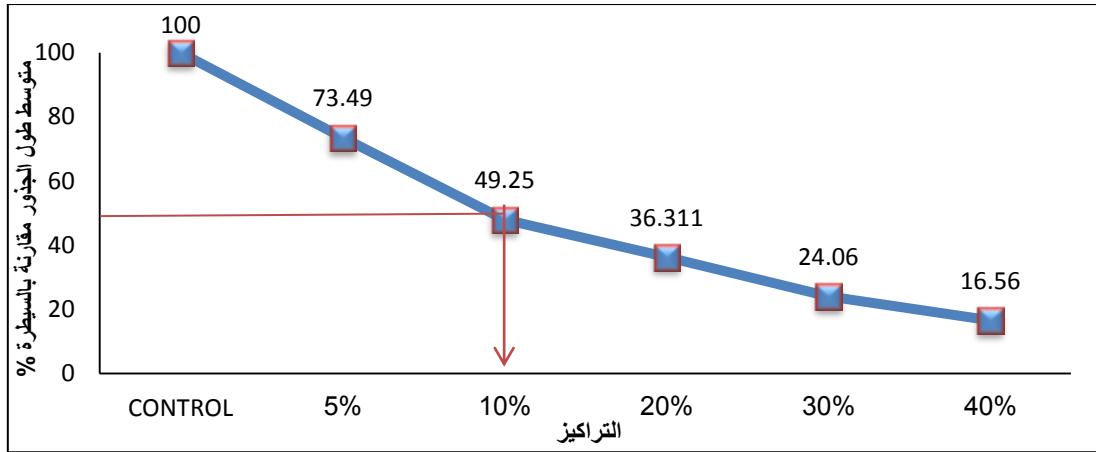
يتضح بشكل عام بأن مستخلصات هلام الصبار قد أدت الى تثبيط متوسط طول جذور نبات البصل مقارنة مع معاملة السيطرة (ماء مقطر) , وقد أدت الزيادة في تركيز المستخلصات الثلاثة الى زيادة في تثبيط متوسط طول الجذور .

يوضح الشكل (4) بأن اعلى تثبيط لمستخلص الخام لهلام الصبار كانت عند تركيز 40 % اذ ثبت متوسط الطول الجذور بنسبة 83.44% مقارنة بمعاملة السيطرة . اما التركيز نصف المؤثر للهلام الخام فكان 10% . اعتماداً على هذه النتيجة تم اختيار خمسة تراكيز لمستخلص الخام لهلام الصبار لغرض دراسة تأثيراتها السمية 2% , 5% , 10% , 20% و 40% .

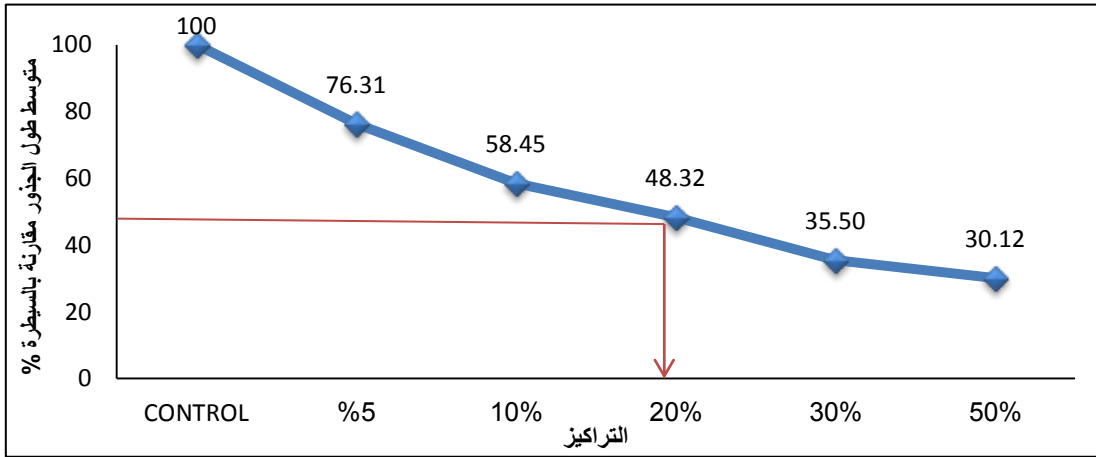
يوضح الشكل (5) تأثير المستخلص الكحولي لهلام الصبار في متوسط طول جذور نبات البصل اذ يوضح الشكل بان التركيز الاعلى تثبيطاً لمتوسط طول الجذور كان 50% اذ ثبت متوسط طول الجذور بنسبة 69.87% اما التركيز الاقل تأثيراً فكان 5% اذ ثبت متوسط الطول بنسبة 23.68% . التركيز نصف المؤثر للمستخلص الكحولي كان 20% لذا تم اختيار التراكيز 5% , 10% , 20% , 30% و 50% لدراسة تأثيرها السمي في جذور نبات البصل .

يبين شكل (6) تأثير المستخلص المائي في متوسط طول جذور نبات البصل ويتضح بأن اعلى تثبيط للمستخلص المائي كان عند التركيز 200% اذ ثبت متوسط الطول الجذور بنسبة 76.50% و اقل تثبيط كان عند التركيز 25% اذ كانت نسبة التثبيط 35.10% اما التركيز نصف المؤثر EC 50% فكان 100% . لذا تم اختيار التراكيز 25% , 50% , 100% , 150% و 200% من المستخلص المائي لهلام الصبار لأجل دراسة سميتها خلويّاً ووراثياً .

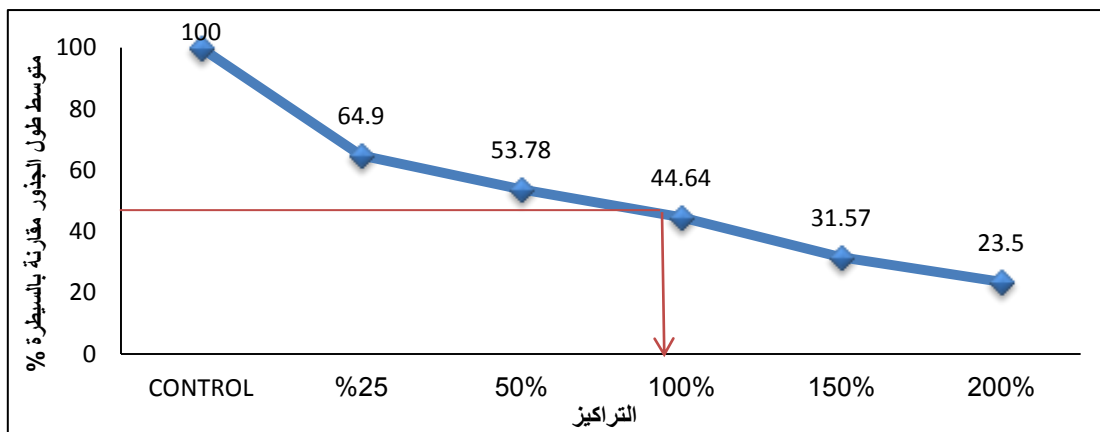
اعتماداً على قيمة التركيز نصف المؤثر يتضح بأن المستخلص الخام كان اكثر تأثيراً في متوسط طول جذور نبات البصل يليه المستخلص الكحولي ثم المستخلص المائي .



شكل (4): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل



شكل (5): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل



شكل (6): تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لهلام الصبار في متوسط طول جذور البصل

4-1-2:دراسات الوراثة الخلوية

4-1-2-1: تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الانقسام MI%

تم دراسة تأثير مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي والمائي) في دليل الانقسام (MI%) ودليل الاطوار لجذور نبات البصل (جدول 5, 6, 7). تبين النتائج بشكل عام بأن مستخلصات هلام الصبار قد أدت الى انخفاض معنوي في دليل الانقسام لجذور نبات البصل , وقد لوحظ ايضا زيادة في انخفاض دليل الانقسام كلما زاد تركيز المستخلص , اذ انخفض دليل الانقسام لجذور البصل المعرضة لمستخلص الهلام الخام للصبار الى 7.45 عند تركيز 2% بعد مدة تعريض 24 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كان دليل الانقسام 10.59 اي بنسبة انخفاض تعادل 29.65% . انخفض دليل الانقسام حتى وصل الى قيمة قدرها 5.49 عند تركيز 10% (التركيز نصف المؤثر) بعد 24 ساعة اي بنسبة انخفاض 48.16% مقارنة بمعامل السيطرة . استمر دليل الانقسام بالانخفاض مع زيادة التراكيز حتى اصبحت قيمته صفرأ عند تركيز 40% لمدة التعريض نفسها اي بنسبة انخفاض 100% اذ توقف الانقسام تماماً كما في جدول (5) و شكل (7) .

يتضح من جدول (5) كذلك بأن دليل الانقسام لجذور البصل المعرضة للهلام الخام لم تتأثر كثيراً بزيادة مدة التعريض اذ انخفض دليل الانقسام الى قيمة قدرها 5.49 عند تركيز 10% بعد مدة تعريض 24 ساعة اي بنسبة انخفاض 48.16% مقارنة بمعاملة السيطرة وانخفض دليل الانقسام الى 4.65 عند التركيز نفسه بعد مدة تعريض 48 ساعة اي بنسبة انخفاض 39.37% مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كانت 7.67 وانخفضت الى 4.37 بعد مدة تعريض 72 ساعة اي بنسبة انخفاض تعادل 42.65% مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كانت 7.62 .

انخفض دليل الانقسام 50% تقريباً في الجذور المعرضة لتركيز 10% من المستخلص الخام عند مدد التعريض الثلاثة فعد هذا التركيز ساماً وشبه مميت . وعد التركيز الاعلى من 30% من المستخلص الخام تركيزاً مميتاً لانه خفض دليل الانقسام تقريباً الى 22% من معاملة السيطرة .

يوضح جدول (6) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لهلام الصبار في دليل انقسام جذور البصل . يتضح من النتائج انخفاض دليل الانقسام معنوياً في جذور نبات البصل عند معاملتها بتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي وكان اعلى تأثير للمستخلص الكحولي عند

تركيز 50% وبمدة تعريض 24 ساعة اذ اصبح دليل الانقسام 2.96 اي بنسبة انخفاض 74.72 % مقارنة بالسيطرة اذ كان دليل الانقسام 11.71 .

انخفض دليل الانقسام تقريباً بنسبة 50% مقارنة بمعاملة السيطرة في الجذور المعرضة لتركيز 20% من المستخلص الكحولي فعد هذا التركيز ساماً و شبه مميت اذ بلغ 4.57, 4.12, 3.90 بعد 24, 48, 72 ساعة على التوالي . وعد التركيز الاكثر من 50% من المستخلص الكحولي مميتاً , لخفضه دليل الانقسام الى 22% تقريباً من معاملة السيطرة اذ بلغ 2.96, 2.73, 2.58 بعد 24, 48, 72 ساعة على التوالي.

اوضحت النتائج كذلك بان دليل الانقسام في جذور البصل لم يتأثر في اغلب العينات باختلاف مدة التعريض للمستخلص الكحولي فكانت قيمته 6.01, 5.47, 4.55 عند التركيز 10% ولمدد تعريض 24, 48, 72 ساعة على التوالي اي بنسبة انخفاض تعادل 48.68% , 38.26% و 42.62% على التوالي (شكل 8) .

جدول رقم (7) يوضح دليل الانقسام والأطوار لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار . يتضح من النتائج انخفاض دليل الانقسام في الجذور المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار وتزداد نسبة الانخفاض كلما زاد تركيز المستخلص المائي وكان اعلى تأثير للمستخلص المائي عند تركيز 200% بعد 24 ساعة تعريض اذ اصبح دليل الانقسام 4.11 اي بنسبة انخفاض تعادل 65.98% مقارنة بالسيطرة .

انخفض دليل الانقسام تقريباً بنسبة 50% في الجذور المعرضة لتركيز 150% من المستخلص المائي فعد هذا التركيز ساماً وشبه مميت اذ بلغ 5.41, 4.72, 3.91 بعد مدة تعريض 24, 48, 72 ساعة على التوالي . وعد التركيز الاكثر من 200% من المستخلص المائي مميتاً وذلك لخفضه دليل الانقسام تقريباً الى 22% من معاملة السيطرة اذ بلغ 4.11, 3.43, 3.26 بعد مدة تعريض 24, 48, 72 ساعة على التوالي .

دلت النتائج كذلك على عدم تأثر دليل الانقسام في عينات جذور البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار بوقت التعرض اذ كان دليل الانقسام عند تركيز 150% , 5.41 بعد 24 ساعة تعريض و اصبح 4.72 بعد 48 ساعة تعريض ثم الى 3.91 بعد 72 ساعة تعريض مقارنة بالسيطرة التي كانت 12.08, 8.93, 7.66 على التوالي اي بنسبة انخفاض تعادل 55.22% , 47.14% و 48.96% على التوالي كما في شكل (9) .

4-1-2-2: تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الاطوار والتشوهات الكروموسومية

1- دليل الطور التمهيدي

يتضح من النتائج بأن دليل الطور التمهيدي قد انخفض بشكل معنوي في جذور نبات البصل المعرضة لجميع تراكيز المستخلصات ولكل مدد التعريض مقارنة بمعاملة السيطرة جدول (5, 6, 7) . ولوحظ ازدياد انخفاض دليل الطور التمهيدي كلما زادت تراكيز المستخلصات بشكل عام ما عدا تركيز 20% بعد مدة تعريض 48 و 72 ساعة اذ كانت قيمته 42.53 و 44.64 على التوالي .

كان اعلى انخفاض لدليل الطور التمهيدي لجذور العينات المعرضة للهلام الخام عند تركيز 40% اذ انخفض الى صفر عند مدد التعريض كافة, اي ان تركيز 40% من الهلام الخام قد اوقف الانقسام في خلايا جذور نبات البصل (شكل 10).

اما في جذر البصل المعرضة للمستخلص الكحولي فكان اعلى انخفاض لدليل الطور التمهيدي عند التركيزين 30% و 50% اذ كان دليل الطور التمهيدي 27.65 و 28.01 على التوالي بعد 24 ساعة تعريض مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كان 56.26 , اي بنسبة انخفاض تعادل 50.85 و 50.21 % على التوالي (شكل 11) .

اما المستخلص المائي فكان اقل دليل طور تمهيدي عند تركيز 200% ولمدة تعريض 72 ساعة اذ انخفض دليل الطور التمهيدي الى 39.59 مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كان 55.92 اي بنسبة انخفاض 29.20% (شكل 12) .

2- دليل الطور الاستوائي

يتضح من الجداول (5, 6, 7) بأن دليل الطور الاستوائي قد ارتفع معنوياً مقارنة بمعاملة السيطرة لعينات جذور البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار وبجميع التراكيز ولكل مدد التعريض , ماعدا تركيز 40% من الهلام الخام الذي أدى الى قتل كامل للخلايا اذ انخفض فيها دليل الطور الاستوائي الى الصفر لمدد التعريض كافة . وكان اعلى ارتفاع لدليل الطور الاستوائي عند تعريض الجذور للهلام الخام بتركيز 10% عند مدة تعريض 48 ساعة اذ اصبحت 41.57 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 19.78 كما في جدول (5) . وكان اعلى ارتفاع لدليل الطور الاستوائي في الجذور المعاملة بالمستخلص الكحولي عند تركيز 50% بعد

24 ساعة تعريض اذ اصبح 50.02 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كان فيها 20.74 كما في جدول (6) . اما في الجذور المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار فكان اعلى ارتفاع لدليل الطور الاستوائي كان عند تركيز 200% بعد 24 ساعة تعريض اذ اصبح 42.83 مقارنة بمعاملة السيطرة اذ كانت 21.19 (جدول 7) .

3- دليل الطور الانفصالي

اما دليل الطور الانفصالي لخلايا جذور نبات البصل المعرضة للهلام الخام لم يتأثر معنوياً عند جميع التراكيز المستعملة ولجميع مدد التعريض ماعدا التركيز 20% ولمدة تعريض 48 ساعة فقد انخفضت معنوياً اذ بلغت 7.85 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 14.75 وعند تركيز 10% ولمدة تعريض 72 ساعة اذ بلغت 11.96 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 14.69 . اضافة الى تركيز 40% الذي عد تركيزاً قاتلاً سبب موتاً كاملاً للخلايا وايقاف تام للنشاط المايوتوزي (جدول 5 , شكل 10) .

عند استعمال المستخلصات الكحولية و المائية على جذور نبات البصل لم يتأثر معنوياً دليل الطور الانفصالي لكل التراكيز ولجميع مدد التعريض مقارنة بمعاملة السيطرة (جداول 6, 7 والاشكال 11, 12) .

4- دليل الطور النهائي

اوضحت النتائج بأن دليل الطور النهائي لجذور نبات البصل المعرضة لمستخلص الهلام الخام لم تتأثر معنوياً عند جميع التراكيز المستعملة وفي جميع مدد التعريض ماعدا التركيز 10% ولمدة تعريض 24 و 48 ساعة فقد انخفض معنوياً فاصبح 10.46 و 9.65 على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 13.44 و 12.44 على التوالي (جدول 5 , شكل 10).

اما المستخلص الكحولي و المائي لهلام الصبار فلم يؤثر معنوياً في دليل الطور النهائي لجذور نبات البصل عند جميع التراكيز وفي جميع اوقات التعريض (جدول 6, 7, و شكل 11, 12).

جدول (5) : متوسط دليل الانقسام ومتوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة لمستخلص الهلام الخام لنبات الصبار

دليل الانقسام MI% ± SE	التشوهات الكروموسومية % ± SE	دليل اطوار الانقسام (%)				التركيز (%)	مدة التعرض (ساعة)
		الطور النهائي ± SE	الطور الانفصالي ± SE	الطور الاستوائي ± SE	الطور التمهيدي ± SE		
1.71±10.59	0.00±0.00	1.61±13.44	1.61±14.99	1.73±18.96*	3.38 ± 52.57	0	24
0.48±7.45*	3.71±21.62*	1.00±12.12	1.61±13.02	3.42±27.25*	3.36±47.60*	2	
0.14±6.03*	1.44±38.21*	1.12±12.25	1.99±13.70	3.30±29.51*	2.53±43.44*	5	
0.23±5.49*	6.35±40.88*	1.13±10.46*	2.47±14.22	1.96±33.18*	4.00±42.01*	10	
0.16±4.15*	3.44±43.75*	1.24±10.92	2.42±12.75	3.07±35.56*	3.76±40.74*	20	
0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	40	
0.82±7.67	0.00±0.00	0.90±12.44	2.43±14.75	1.91±19.78	3.69±53.01	0	48
0.24±6.51*	1.25±22.84*	1.19±10.35	1.23±11.65	4.04±30.35*	5.10±46.62*	2	
0.27±5.33*	3.72±43.82*	1.58±10.40	1.47±11.87	5.33±32.62*	6.48±45.01*	5	
0.21±4.65*	2.20±53.65*	1.17±9.65*	1.61±10.74	3.39±41.57*	1.39±38.01*	10	
0.16±3.54*	4.56±60.45*	1.03±10.69	1.03±7.85*	2.37±38.90*	2.85±42.53*	20	
0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	40	
1.75±7.62	0.00±0.00	1.74±13.21	1.59±14.69	2.14±21.41	1.79±50.58*	0	72
1.30±5.74*	1.64±25.90*	1.67±12.82	2.52±13.27	2.80±28.09*	4.74±45.82*	2	
1.07±4.77*	3.72±49.15*	1.05±13.78	0.85±9.31	2.37±31.63*	3.48±45.26*	5	
0.96±4.37*	4.70±60.37*	1.17±10.38	1.69±11.96*	4.01±37.81*	4.20±35.82*	10	
1.00±3.14*	1.73±75.80*	2.19±9.14	3.65±16.10	4.07±35.85*	5.46±44.84*	20	
0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	0.00±0.00*	40	

* معنوية عند $P < 0.05$

SE الخطأ القياسي

جدول (6): متوسط دليل الانقسام ومتوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لهلام الصبار

دليل الانقسام MI% ± SE	التشوهات الكروموسومية % ± SE	دليل اطوار الانقسام(%)				التركيز (%)	مدة التعرض (ساعة)
		الطور النهائي ±SE	الطور الانفصالي ±SE	الطور الاستوائي ±SE	الطور لتهدي ±SE		
1.34 ±11.71	0.00±0.00	1.17 ±9.69	1.44±13.31	1.01±20.74	3.13±56.26	0	24
0.16±6.78*	2.10±24.48*	1.32 ±9.11	1.09±13.58	2.29±35.53*	0.73±41.45*	5	
0.38±6.01*	3.07±44.04*	1.35 ±8.03	1.71±15.22	1.16±40.01*	1.99±36.65*	10	
0.10±4.57*	0.76±48.35*	1.54 ±9.04	1.54±16.46	1.97±42.44*	1.42±31.55*	20	
0.18±4.14*	1.99±54.37*	1.17 ±8.08	2.79±17.59	1.49±46.67*	2.25±27.65*	30	
0.08±2.96*	7.59±73.83*	1.70 ±8.00	1.70±13.96	1.39±50.02*	2.30±28.01*	50	
0.95 ±8.86	0.00±0.00	0.91 ±10.1	1.36±13.25	2.53±22.51	4.93±54.06	0	48
0.30±5.74*	3.34±35.92*	1.32 ±9.78	0.95±13.92	2.63±35.68*	2.66±40.41*	5	
0.41±5.47*	4.12±47.62*	1.61 ±9.32	1.94±14.22	2.07±39.69*	3.94±36.77*	10	
0.36±4.12*	6.43±58.33*	2.18 ± 8.33	1.80±14.30	2.58±45.14*	1.98±32.22*	20	
0.24±3.94*	3.39±64.10*	2.15 ±8.41	1.73±14.38	3.62±42.38*	3.61±34.81*	30	
0.24±2.73*	2.36±74.45*	1.60±9.65	2.11±16.40	3.52±43.91*	3.00±30.03*	50	
0.36 ±7.93	0.0 ±0.00	1.56±12.46	2.77±15.71	2.02±21.52	2.94±50.30	0	72
0.31±5.47*	4.06±37.24*	1.25± 9.52	1.46±14.25	4.00±33.98*	5.45±42.22*	5	
0.26±4.55*	5.35±51.56*	1.35±11.58	1.83±11.85	5.60±45.92*	4.39±30.61*	10	
0.24±3.90*	5.63±63.87*	1.63±10.36	2.84±12.20	2.21±40.85*	2.57±35.37*	20	
0.34±3.46*	1.71±65.90*	1.08±11.77	1.30±12.73	2.17±42.14*	2.61±33.34*	30	
0.10±2.58*	2.95±78.29*	0.76±11.95	1.07±10.96	1.80±45.65*	2.22±31.38*	50	

* معنوية عند $P < 0.05$

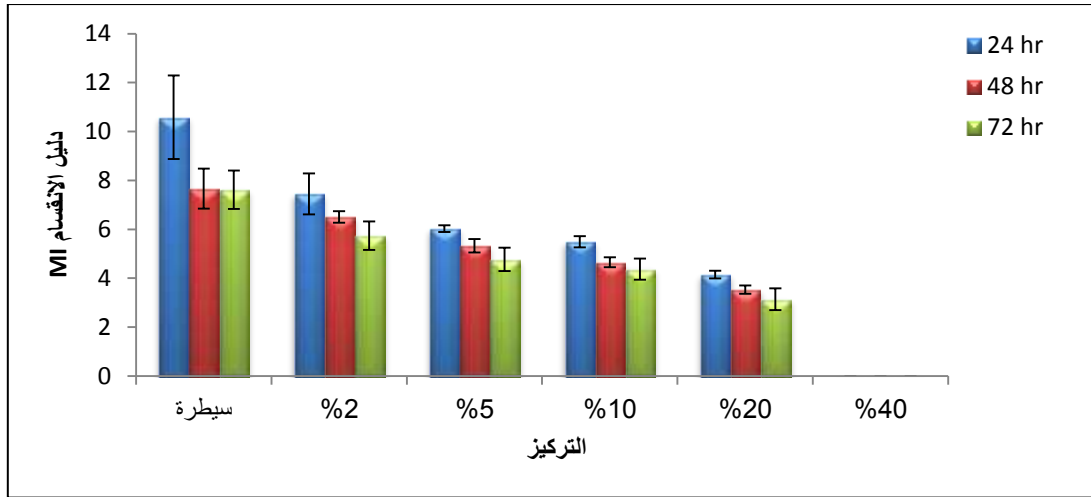
SE الخطأ القياسي

جدول (7): متوسط دليل الانقسام ومتوسط دليل الاطوار ونسبة التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار

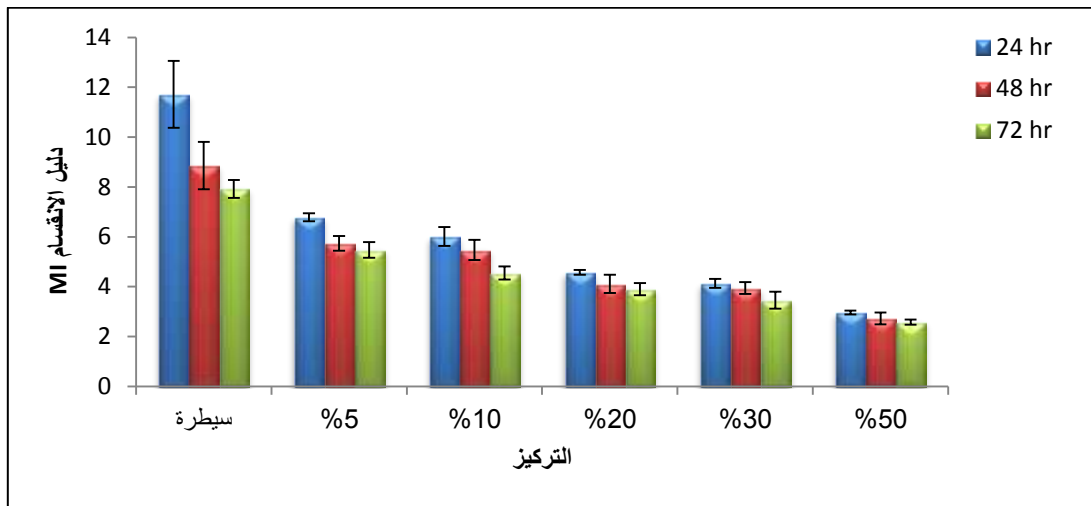
دليل الانقسام MI% ± SE	التشوهات الكروموسومية % ± SE	دليل اطوار الانقسام(%)				التركيز (%)	مدة التعرض (ساعة)
		الطور النهائي ±SE	الطور الاتصالي ±SE	الطور الاستوائي ±SE	الطور لتمهيدي ±SE		
0.75±12.08	0.00±0.00	1.12±8.96	1.42±11.84	1.12±21.19	3.37±57.88	0	24
0.69±9.87*	2.11±24.95*	1.50±10.12	1.58±12.41	2.17±28.16*	2.12±49.30*	25	
0.69±7.77*	2.99±38.76*	0.62±11.87	2.19±14.17	1.82±31.69*	1.95±42.26*	50	
0.28±6.92*	1.06±42.49*	1.23±12.63	1.96±12.64	2.23±34.36*	3.17±40.37*	100	
0.97±5.41*	1.01±49.81*	0.59±10.69	0.95±13.92	1.78±36.65*	1.73±38.72*	150	
0.42±4.11*	2.82±60.87*	1.68±10.55	1.42±13.73	1.33±42.83*	1.88±32.88*	200	
0.75±8.93	0.00±0.00	1.36±9.56	1.52±13.96	2.16±22.98	2.23±53.50	0	48
0.69±7.77*	3.64±34.02*	1.02±11.31	0.95±15.38	2.14±26.22*	3.97±47.09*	25	
0.69±6.55*	2.41±39.51*	1.43±10.92	2.10±14.73	2.04±30.72*	4.00±43.63*	50	
0.28±5.78*	1.26±47.06*	0.57±10.49	1.07±14.89	2.23±32.02*	4.09±42.57*	100	
0.97±4.72*	1.93±56.78*	0.86±11.07	1.66±15.88	1.61±32.59*	2.56±40.45*	150	
0.42±3.43*	2.65±62.07*	0.57±11.21	1.04±16.81	1.26±35.45*	1.43±36.53*	200	
0.61±7.66	0.00±0.00	1.47±10.25	1.66±11.42	1.69±22.28	2.23±55.92	0	72
0.25±6.74*	3.59±39.17*	1.28±11.48	1.25±13.33	1.88±21.51*	3.97±53.68*	25	
0.33±5.82*	1.69±41.58*	1.40±12.12	2.27±14.22	1.65±23.33*	4.00±50.23*	50	
0.48±4.80*	1.02±50.00*	1.36±12.06	1.85±12.08	4.36±26.42*	4.09±49.41*	100	
0.15±3.91*	1.28±64.62*	1.45±11.48	1.49±14.00	1.99±30.16*	2.56±43.15*	150	
0.34±3.26*	1.14±73.72*	0.96±14.90	1.01±12.98	1.27±32.49*	1.43±39.59*	200	

* معنوية عند $P < 0.05$

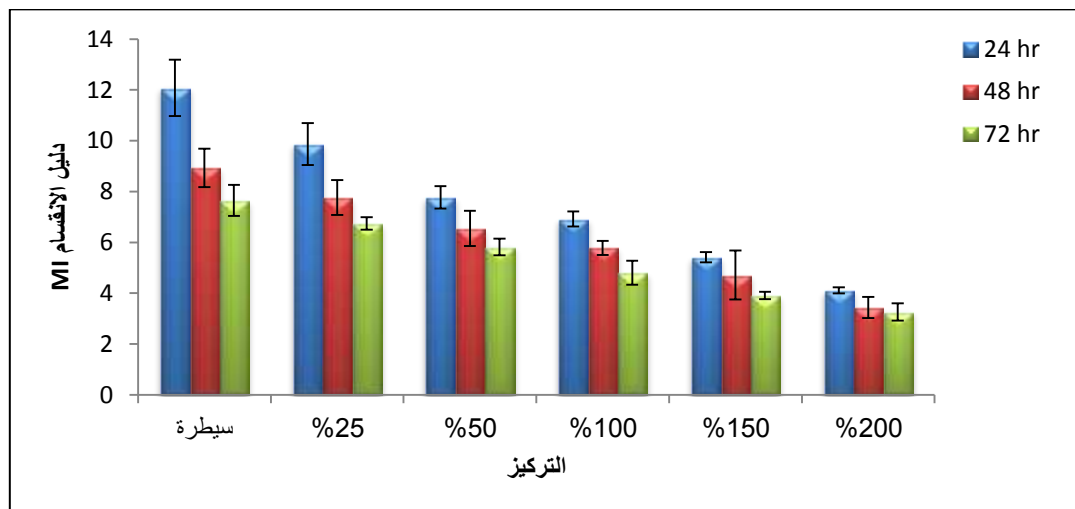
SE الخطأ القياسي



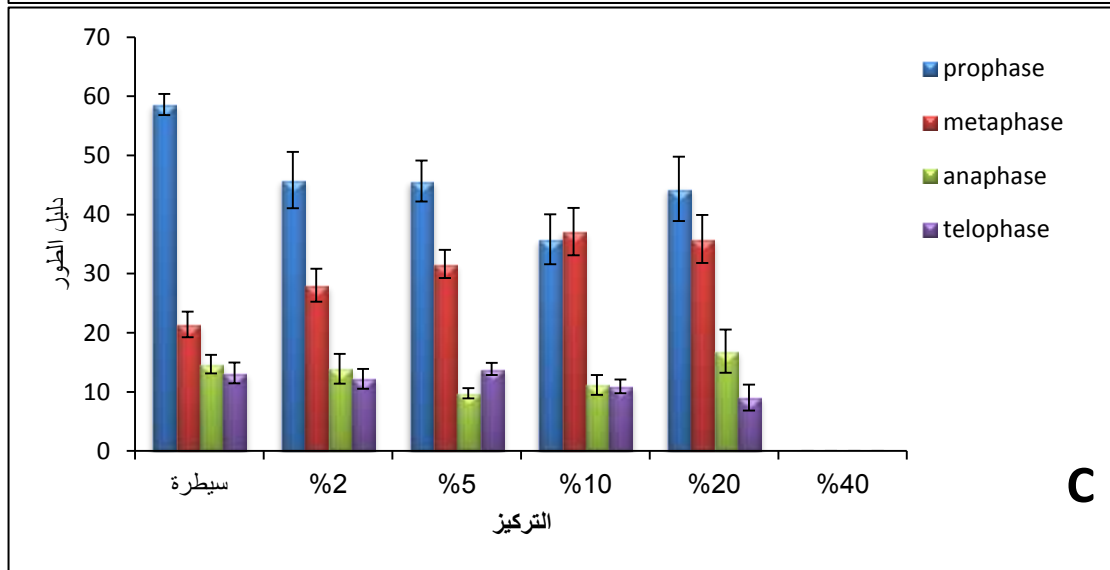
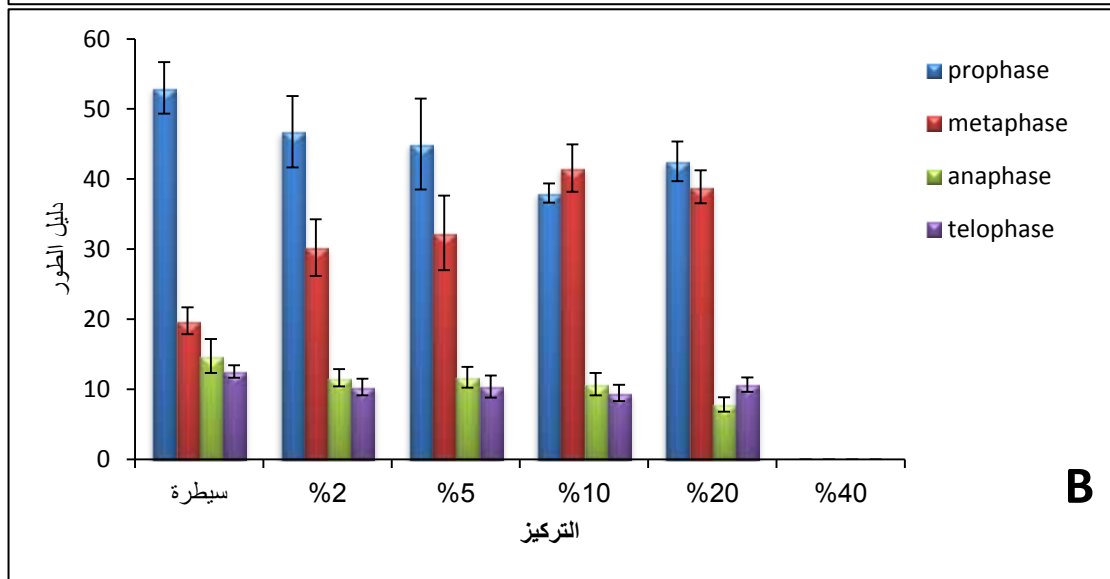
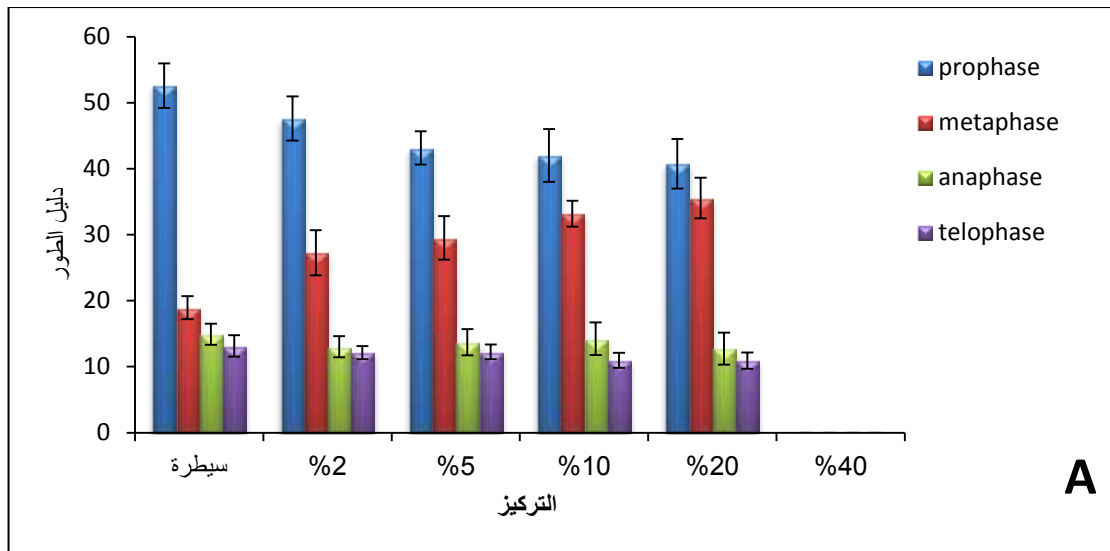
شكل (7): دليل الانقسام MI % في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة لمستخلص الخام لهلام الصبار



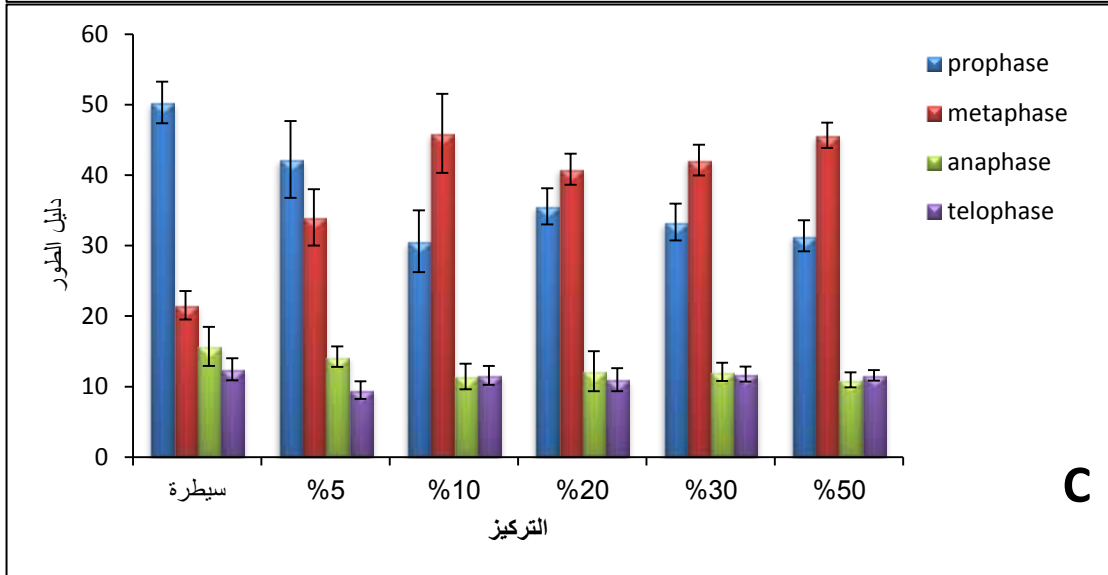
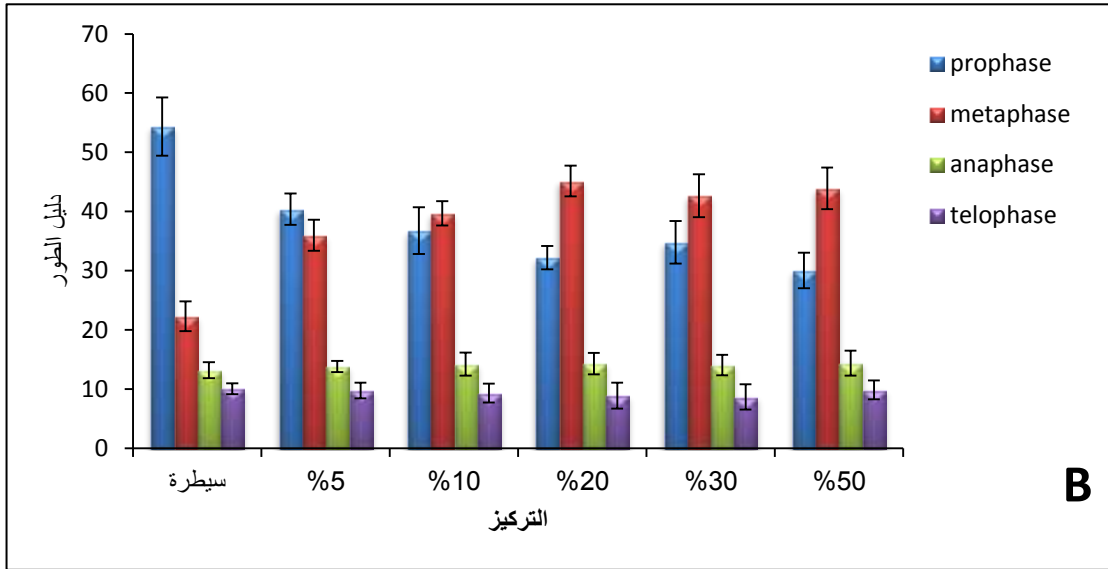
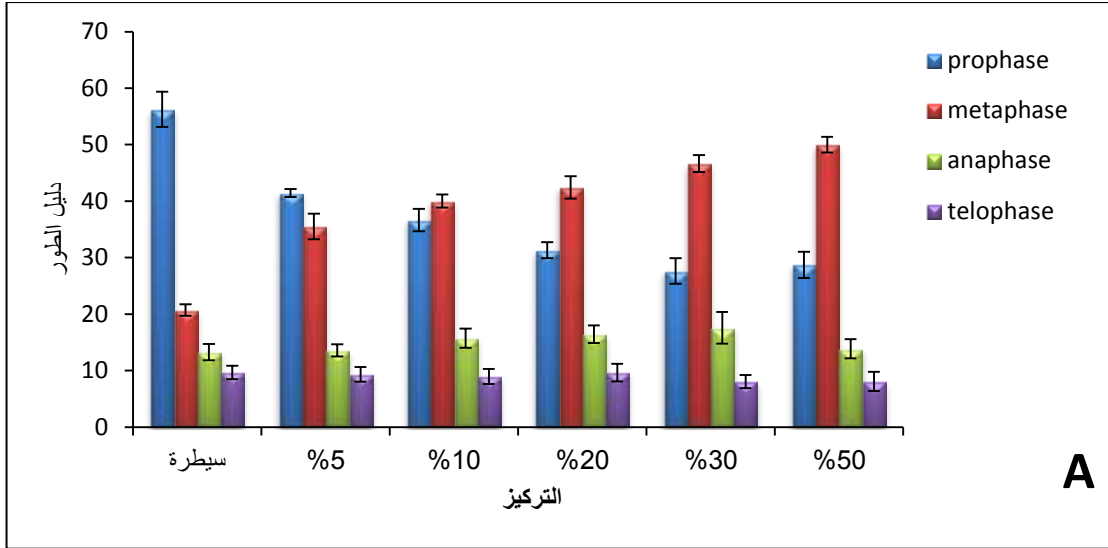
شكل (8): دليل الانقسام MI % في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لهلام الصبار



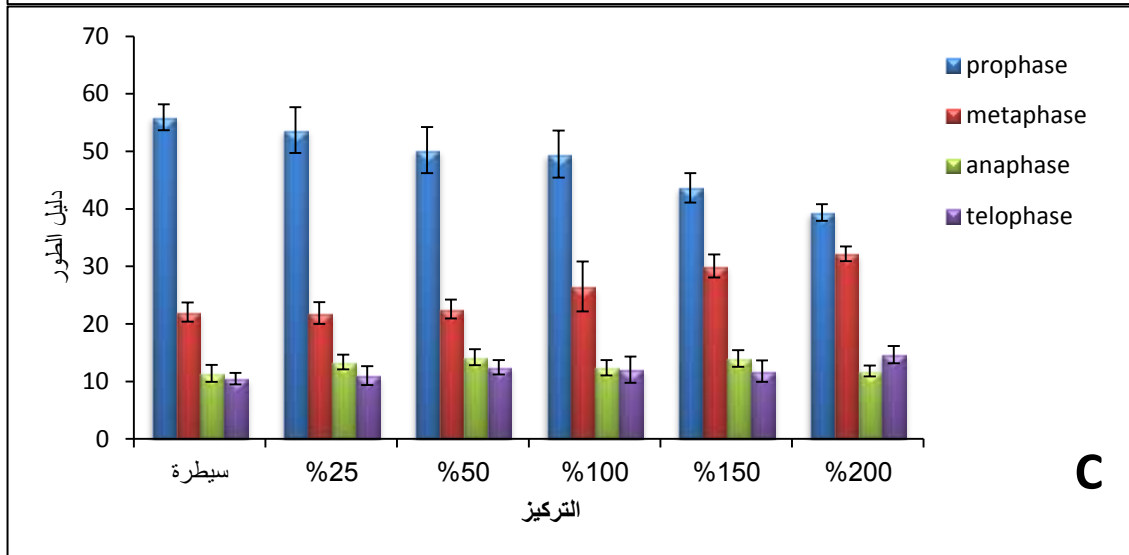
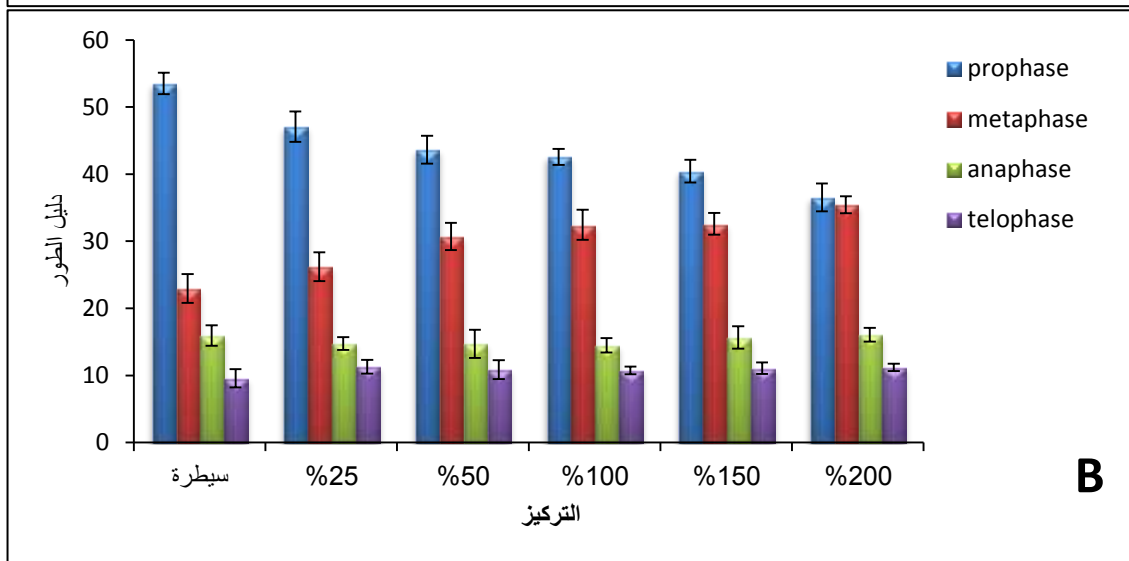
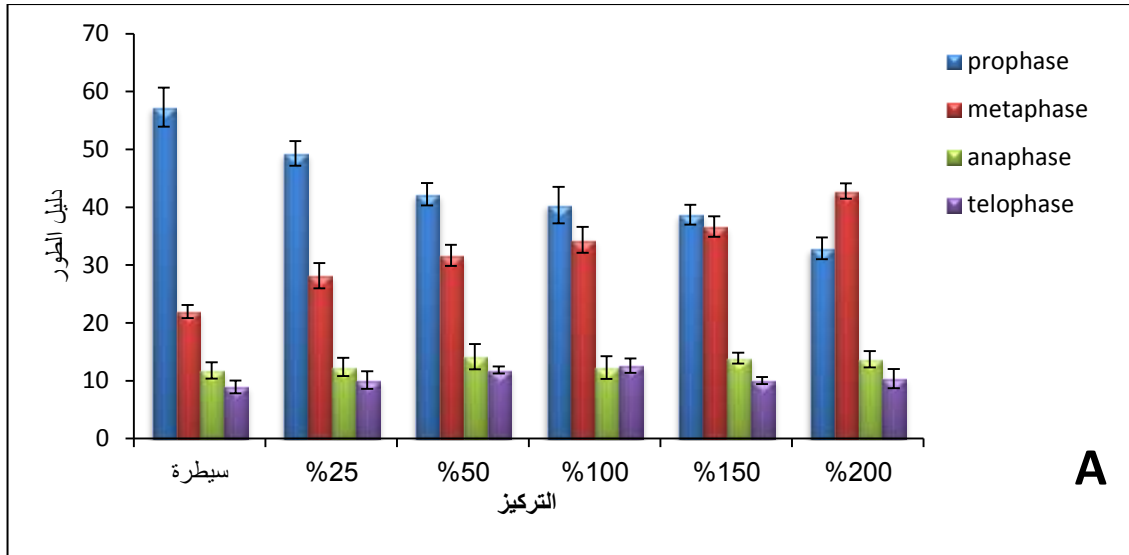
شكل (9): دليل الانقسام MI % في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار



شكل (10): دليل اطوار الانقسام المايوتوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام الصبار . A: بعد مدة تعريض 24 ساعة , B: بعد مدة تعريض 48 ساعة , C: بعد مدة تعريض 72 ساعة



شكل (11): دليل اطوار الانقسام المايوتوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار. A: بعد مدة تعريض 24 ساعة, B: بعد مدة تعريض 48 ساعة, C: بعد مدة تعريض 72 ساعة.



شكل (12): دليل اطوار الانقسام المايئوزي للقمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار . A: بعد مدة تعريض 24 ساعة . B: بعد مدة تعريض 48 ساعة , C: بعد مدة تعريض 72 ساعة

5- التشوهات الكروموسومية

يتضح من جدول (5, 6, 7) ان مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) قد سببت ارتفاعاً معنوياً في نسبة حدوث التشوهات الكروموسومية وعند جميع التراكيز المستعملة ولكل مدد التعريض . يتضح كذلك بأن نسبة الشذوذ الكروموسومي ازدادت بشكل معنوي مع زيادة التراكيز وزيادة مدد التعريض اذ اصبحت اكثر من 50% عند التراكيز العالية (الاعلى من التركيز نصف المؤثر) من المستخلصات . كانت اعلى نسبة تشوهات كروموسومية في الخلايا المعرضة لمستخلص الهلام الخام للصبار عند التركيز 20% ولمدة تعريض 72 ساعة اذ كانت 75.80% اما عند استعمال المستخلص الكحولي من هلام الصبار فقد وجدت اعلى نسبة تشوهات كروموسومية تعادل 78.29% عند تركيز 50% ولمدة تعريض 72 ساعة . وكانت اعلى نسبة تشوهات كروموسومية عند استعمال المستخلص المائي من هلام الصبار 73.72 عند التركيز 200% ولمدة تعريض 72 ساعة ايضاً (شكل 13, 14, 15) .

وجدت انواع عديدة من التشوهات الكروموسومية عند المعاملة بمستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) وظهر بان التشوهات الاكثر تكراراً هي اللزوجة الكروموسومية Stickiness , التثنت الكروموسومي Disturbed chromosome , الجسور الكروموسومية Bridge , الاستوائي كولشسيني C-mitosis , الكروموسومات المتأخرة Vagrant , فضلاً عن ذلك فقد ظهر الشكل النهائي النجمي Star telophase وباعداد قليلة (شكل 16 و جدول 8, 9, 10) .

اتضح بأن اكثر انواع التشوهات الكروموسومية ظهوراً هو الكروموسومات اللزجة اذ كان عدد الخلايا التي تحتوي هذا النوع من الشذوذ 813 , 1089 و 1061 عند استعمال المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي ثم يليه الكروموسومات المتثنتة اذ كان مجموع الخلايا التي تحتوي على هذا النوع من التشوهات 402 , 310 و 508 عند استعمال المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي , ثم ظهور الجسور الكروموسومية اذ كان مجموع الخلايا التي تحتوي هذا النوع من التشوهات 128 , 121 و 101 عند استعمال المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي (جدول 8, 9, 10) .

ظهرت الانواع الثلاثة من التشوهات الكروموسومية (الكروموسومات اللزجة , الكروموسومات المتثنته , الجسور الكروموسومية) في جذور البصل عند جميع التراكيز المستعملة ولجميع مدد التعريض للمستخلصات الثلاثة (الخام , الكحولي و المائي) لهلام الصبار .

اما انواع التشوهات الكروموسومية الشكل الاستوائي الكولشيسي , الكروموسومات المتاخرة و النهائي النجمي فلم تظهر في جميع تراكيز المستخلصات او مدد التعريض المختلفة اذ ظهرت بنسبة اقل . كان مجموع الخلايا التي تحتوي على التشوه الكروموسومي من نوع الشكل الاستوائي الكولشيسي C-mitosis , 53 , 118 و 167 , والكروموسومات المتاخرة Vagrant , 21, 59 و 106 عند استعمال المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي . اما الطور النهائي النجمي Star teophace كان مجموع الخلايا التي تحتوي هذا النوع من التشوهات 1 , 7 و 5 عند استعمال المستخلصات الخام , الكحولي و المائي على التوالي .

جدول (8): أنواع التثوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام الصبار

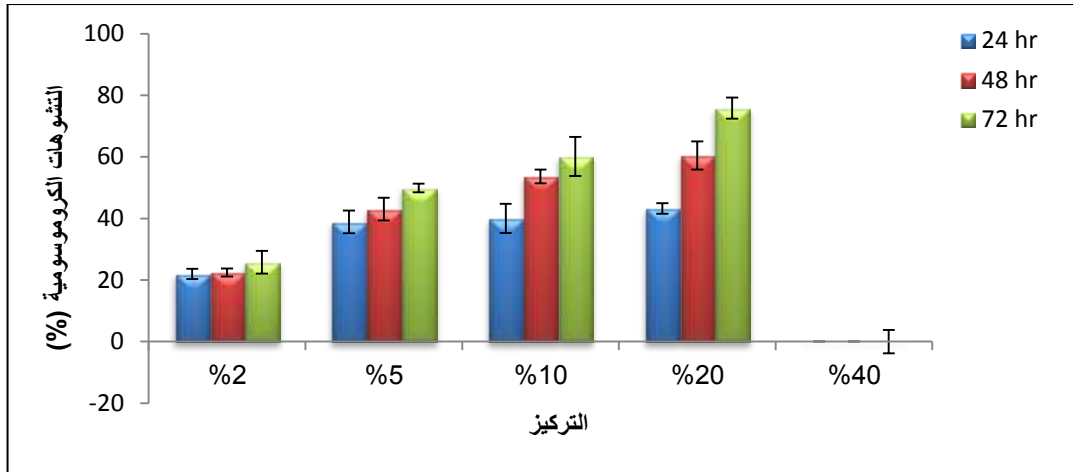
التثوهات الكروموسومية %	أنواع التثوهات الكروموسومية						عدد الخلايا المنقسمة	تركيز (%)	مدة التعريض (ساعة)
	الكروموسومات اللزوجة	التثتت الكروموسومي	الجسور الكروموسومية	الشكل الاستوائي الكولشيسيني	الكروموسومات المتأخرة	النهائي النجمي			
21.62	48	23	9	0	0	0	370	2	24
38.21	48	33	22	1	11	0	301	5	
40.88	91	7	7	0	7	0	274	10	
43.75	70	7	8	0	5	1	208	20	
0	0	0	0	0	0	0	0	40	
22.84	45	19	10	0	0	0	324	2	48
43.82	52	26	17	10	12	0	267	5	
53.65	112	10	3	0	0	0	233	10	
60.45	60	20	10	12	5	0	177	20	
0	0	0	0	0	0	0	0	40	
25.90	53	3	15	0	1	0	278	2	72
49.15	63	28	6	10	8	0	234	5	
60.37	109	8	11		3		217	10	
75.80	62	20	10	20	7	0	157	20	
0	0	0	0	0	0	0	0	40	
	813	402	128	53	59	1		المجموع	

جدول (9): انواع التثوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار

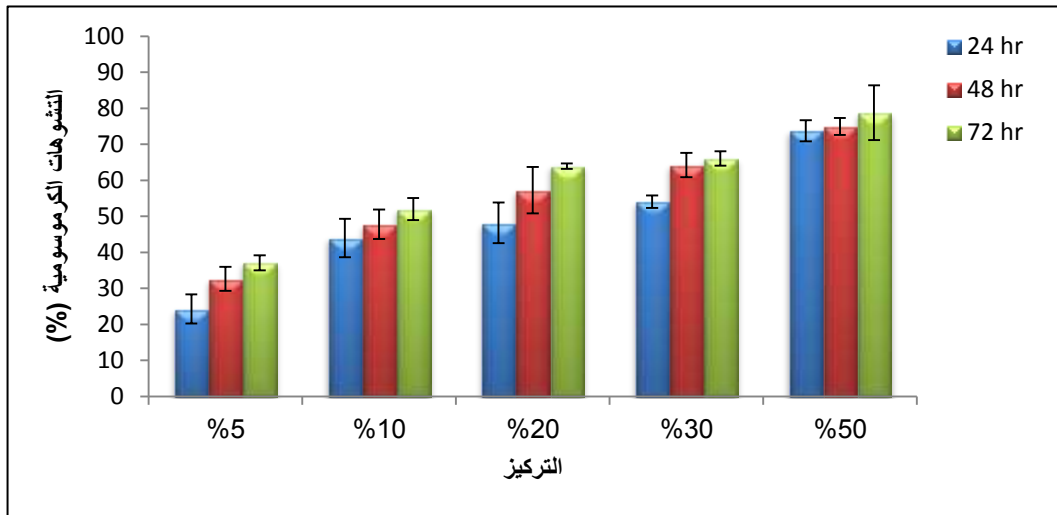
التثوهات الكروموسومية %	انواع التثوهات الكروموسومية						عدد الخلايا المنقسمة	تركيز (%)	مدة التعريض (ساعة)
	الكروموسومات الزوجية	التثت الكروموسومي	الجسور الكروموسومية	الشكل الاستواني الكولشيسي	الكروموسومات المتأخرة	النهائي النجمي			
24.48	53	13	7	6	3	1	339	5	24
44.04	81	20	10	16	4	2	302	10	
48.35	68	22	12	7	1	0	229	20	
54.37	75	21	11	4	0	1	206	30	
73.83	80	20	5	5	0	0	149	50	
35.92	65	24	3	4	5	1	284	5	48
47.62	86	28	1	13	1	1	273	10	
58.33	82	19	8	8	0	0	204	20	
64.10	92	21	8	3	1	0	195	30	
74.45	55	25	7	15	0	0	137	50	
37.24	49	14	15	7	4	0	239	5	72
51.56	82	18	1	13	1	1	225	10	
63.87	88	21	5	7	1	0	191	20	
65.90	81	20	13	0	0	0	173	30	
78.29	52	24	15	10	0	0	129	50	
	1089	310	121	118	21	7		المجموع	

جدول (10): أنواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار

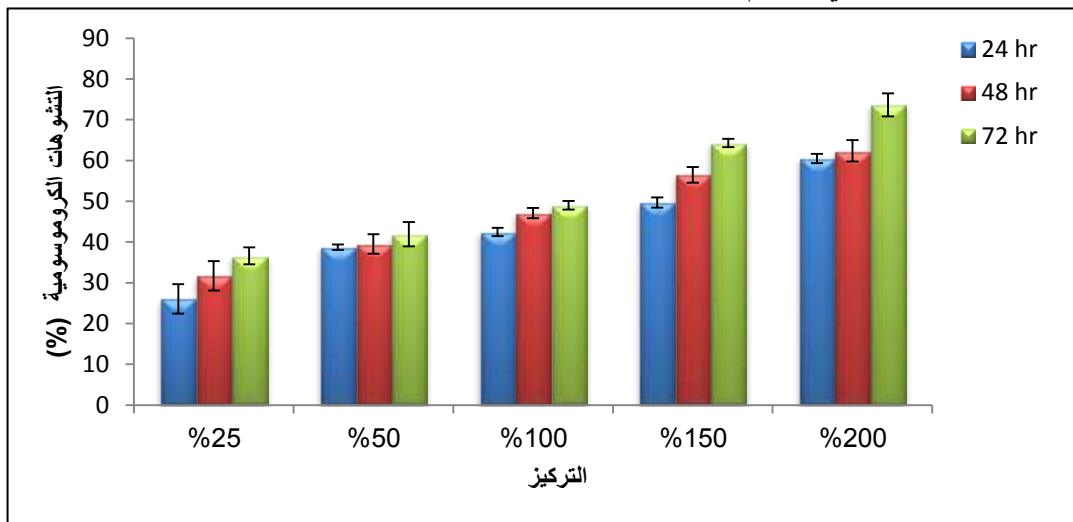
التشوهات الكروموسومية %	انواع التشوهات الكروموسومية						عدد الخلايا المنقسمة	تركيز (%)	مدة التعريض (ساعة)
	الكروموسومات اللزوجة	التشنت الكروموسومي	الجسور الكروموسومية	الشكل الاستوائي الكولشيسيني	الكروموسومات المتأخرة	النهائي النجمي			
24.95	68	34	9	4	0	0	461	25	24
38.76	65	43	5	26	11	0	387	50	
42.49	70	47	7	16	7	0	346	100	
49.81	75	35	8	10	5	1	269	150	
60.87	63	36	5	12	10	0	207	200	
34.02	78	32	10	9	2	1	388	25	48
39.51	62	36	10	10	12	0	329	50	
47.06	100	10	3	13	10	0	289	100	
56.78	90	38	10	12	5	0	273	150	
62.07	49	36	5	8	10	0	174	200	
39.17	68	42	10	9	2	1	337	25	72
41.58	62	36	5	10	6	2	291	50	
50.00	80	21	3	8	9	0	242	100	
64.62	73	30	6	10	7	0	195	150	
73.72	58	32	5	10	10	0	156	200	
	1061	508	101	167	106	5		المجموع	



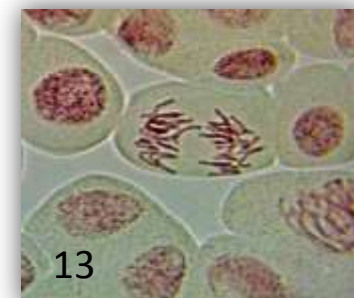
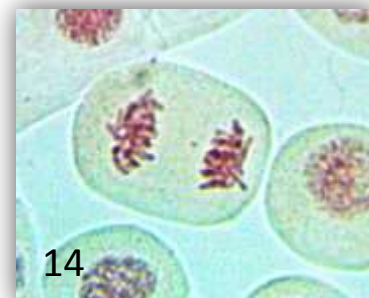
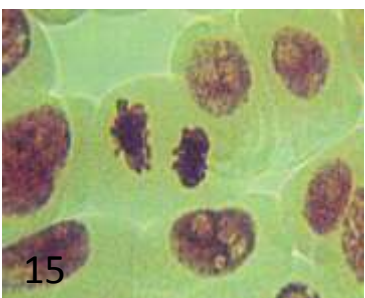
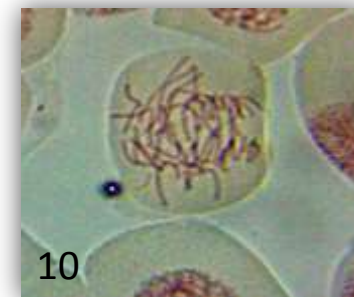
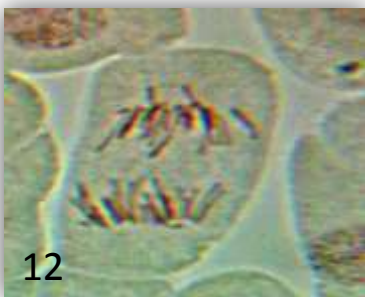
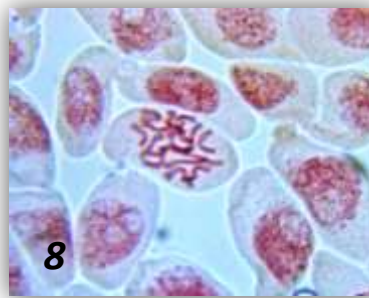
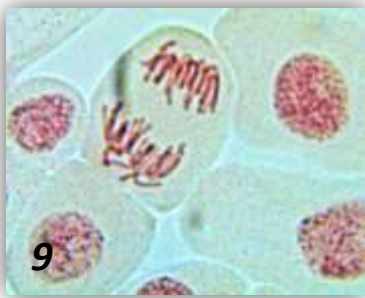
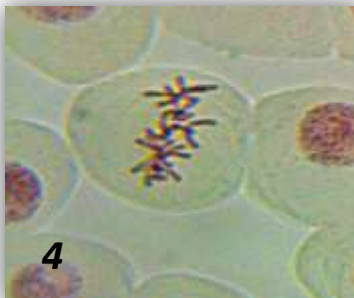
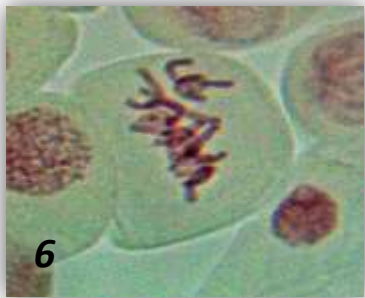
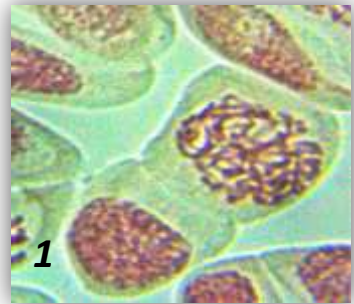
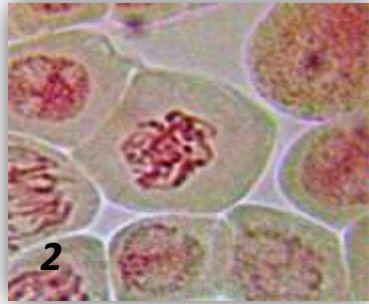
شكل (13): نسبة التشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لهلام الصبار

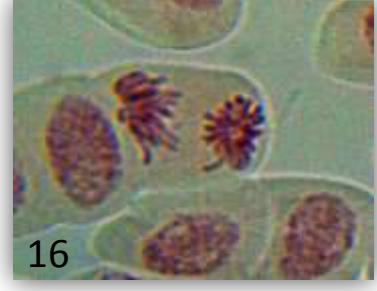
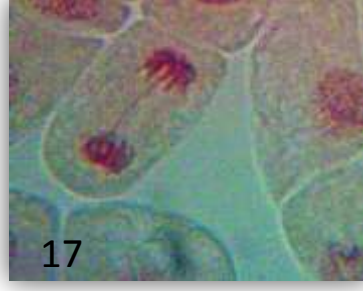


شكل (14): نسبة تشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لهلام الصبار



شكل (15): نسبة تشوهات الكروموسومية لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لهلام الصبار .





شكل (16): انواع التشوهات الكروموسومية في القمم النامية لجذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار وباوقات تعريض مختلفة (قوة التكبير X 40).

1- طور تمهيدي طبيعي 2- طور تمهيدي لزج 3- تشتت كروموسومي 4- طور استوائي طبيعي 5- طور استوائي مشتت 6- قطعة كروموسومية متاخرة في الطور الاستوائي 7 - استوائي لزج 8- طور الاستوائي الكولشيسي 9- طور انفصالي طبيعي 10, 11- جسر في الطور الانفصالي 12- قطعة متاخرة في الطور الانفصالي 13- تشتت في الطور الانفصالي 14- طور نهائي طبيعي 15- طور نهائي لزج 16- طور نهائي نجمي 17 - جسر في الطور النهائي 18- تشتت في الطور النهائي

3-1-4: الدراسة الجزيئية

1-3-1-4: تفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا (RAPD)

استعملت عشر بواقي لتفاعلات التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال للدنا

,OPA-9,OPA-8,OPA-7,OPA-6,OPA-5,OPA-4,OPA-3,OPA-2,OPA-1)

(OPA10, للكشف عن السمية الوراثية في جذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي). البواقي OPA-1,OPA-3,OPA-6 و OPA-10 لم تظهر اية حزم مع جميع العينات لذلك قد تم اهمالها , اما البواقي الاخرى فقد اظهرت حزمًا متعددة الاشكال مع جميع العينات .

اعتمدت طريقة تحليل النتائج على ظهور او غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من المجين للعينات المعرضة للمستخلصات مقارنة بعينة السيطرة وقد املت الحزم الخفيفة جداً. اما التباين المعتمد على شدة التآلق Intensity فلم يعتمد كمقياس للتباين الوراثي وذلك لان التركيز الدقيق للدنا من الصعوبة تحديده نظراً لتأثره بعدة عوامل .

اوضحت نتائج التضاعف العشوائي RAPD وجود اختلافات في نواتج تضاعف العينات المعاملة بالمستخلصات مقارنة بمعاملة السيطرة وظهرت هذه الاختلافات على شكل فقدان لبعض الحزم او اضافة لحزم جديدة موضحة بالجدول (11, 12, 13) والاشكال (17-23) .
يبين جدول (11) والاشكال (17-23) نتائج التضاعف العشوائي للعينات المعرضة لمستخلص الهلام الخام . يتضح من النتائج بأن البودائ السبعة اعطت اربعة واربعين (44) حزمة مع معاملة السيطرة وبأوزان جزيئية تراوحت بين 100-1600 زوج قاعدة . وتبين ايضاً بأن العينات المعاملة بالتركيز 2% (اقل من التركيز نصف المؤثر) قد فقدت ما مجموعه حزمتان بأوزان جزيئية 860 و 1025 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 ولم يلاحظ اية اضافة لحزم جديدة مع جميع البودائ . اما استعمال التركيز 5% (الاقل من التركيز نصف المؤثر) من مستخلص الهلام الخام فلو حظ فقدان حزمة واحدة بوزن جزيئي 860 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 ولم يلاحظ ظهور اية حزمة جديدة . عند استعمال التركيز 10% (التركيز نصف المؤثر) من مستخلص الهلام الخام لم يلاحظ تأثير للمستخلص في دنا جذور نبات البصل اذ لم يلاحظ اي اختفاء او ظهور لاية حزمة جديدة مقارنة بمعاملة السيطرة و لجميع البودائ .

اظهرت العينات المعرضة للتركيز الاعلى من التركيز نصف المؤثر من مستخلص الهلام الخام 20% (2X EC50%) اختفاء ما مجموعه اربع حزم ثلاثة منها مع البادئ OPA-2 وبأوزان جزيئية 415, 498 و 580 زوج قاعدة وحزمة واحدة مع البادئ OPA-8 وبوزن جزيئي 341 زوج قاعدة فضلاً عن ظهور حزمة جديدة بوزن جزيئي 1077 زوج قاعدة مع البادئ OPA-4 , اما العينات المعرضة الى 40% (4X EC 50%) فكان مجموع الحزم المفقودة ست حزم خمسة منها بأوزان جزيئية 324, 373, 415 , 860 و 1025 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 وحزمة واحدة بوزن جزيئي 341 مع البادئ OPA-8 وظهر حزمة واحدة بوزن جزيئي 431 زوج قاعدة مع البادئ OPA-3 وحزمة واحدة بوزن جزيئي 1077 زوج قاعدة مع البادئ OPA-4 . يتضح من النتائج بأن التراكيز العالية من المستخلص الخام (اعلى من التركيز نصف المؤثر) كان لها تأثير اكبر في دنا جذور نبات البصل مقارنة بالتراكيز الواطئة لاسيما عند استعمال التركيز 40% اذ كان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة 2, 0, 1, 5 و 8 عند التراكيز 2%, 5%, 10%, 20% و 40% على التوالي.

يوضح الجدول (12) والاشكال (17 - 23) نتائج التضاعف العشوائي لدنا جذور نبات البصل المعرض للمستخلص الكحولي لهلام الصبار . يتضح بأن تركيز 5% من المستخلص الكحولي لم يظهر اي تأثير في الدنا جذور نبات البصل اذ لم يلاحظ ظهور او اختفاء اية

حزمة مقارنة مع السيطرة اما تركيز 10% (1/2 EC50) فلو حظ اختفاء حزمتين بوزن جزيئي 860 , 1025 زوج قاعدة عند استعمال البادئ OPA-2 وفقدان حزمة واحدة بوزن جزيئي 1537 زوج قاعدة عند استعمال البادئ OPA-8 . وعند استعمال التركيز نصف المؤثر 20% فقد لوحظ ظهور لحزمة جديدة بوزن جزيئي 1077 عند استعمال البادئ OPA-4 عند استعمال التراكيز العالية من المستخلص الكحولي 30% , 50% (اعلى من التركيز نصف المؤثر) لوحظ ارتفاع عدد الحزم المفقودة اذ وجد حزمتان مفقودتان عند تركيز 30% بأوزان جزيئية 860 , 1025 ووجدت خمس حزم مفقودة عند اعلى تركيز 50% حزمتان مع البادئ OPA-2 بوزن جزيئي 860 و 1025 زوج قاعدة وثلاثة حزم مع البادئ OPA-4 وبأوزان جزيئية 169 , 649 و 1328 زوج قاعدة . يتضح من النتائج بأن التراكيز العالية من المستخلص الكحولي (اعلى من التركيز نصف المؤثر) كان لها تأثير اكبر في دنا جذور نبات البصل مقارنة بالتراكيز الواطنة اذ كان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة 0, 1, 3, 2 و 5 عند التراكيز 5% , 10% , 20% , 30% و 50% على التوالي .

يبين جدول (13) والاشكال (17- 23) نتائج التضاعف العشوائي لدنا جذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لهلام الصبار . احدث تركيز 25% (الاقل من التركيز نصف المؤثر) (1/4 EC50) فقدان خمس حزم اربع حزم منها بأوزان جزيئية 373 , 415, 860 و 1025 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 وحزمة واحدة بوزن جزيئي 1537 زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 . اما تركيز 50% (التركيز الاقل من 50% EC50) (1/2 EC50) فقد ظهرت حزمة واحدة جديدة بوزن جزيئي 200 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 وفقدت حزمة واحدة بوزن جزيئي 341 زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 . اما التركيز نصف المؤثر 100% فقد لوحظ فقدان ثلاث حزم اثنان منها بوزن جزيئي 860 و 1025 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 وحزمة بوزن جزيئي 341 زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 . عند استعمال التراكيز العالية 150% (التركيز الاعلى من نصف المؤثر) لوحظ فقدان حزمتين بوزن جزيئي 860 و 1025 زوج قاعدة مع البادئ OPA-2 وحزمة بوزن جزيئي 406 زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 . عند استعمال اعلى تركيز من المستخلص المائي 200% وجد ارتفاع ملحوظ في الحزم المفقودة والمكتسبة فوجدت تسع حزم مفقودة , سبع منها مع البادئ OPA-2 باوزان جزيئية 324 , 373 , 415 , 691 , 704 , 860 و 1025 زوج قاعدة وحزمة واحدة بوزن جزيئي 431 زوج قاعدة مع البادئ OPA-3 وحزمة بوزن جزيئي 341 زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 فضلاً عن اربع حزم مكتسبة باوزان جزيئية 344 , 376, 506 و 989 زوج قاعدة مع البادئ OPA-3 . يتضح بشكل عام بأن التراكيز العالية)

اعلى من التركيز نصف المؤثر) من المستخلص المائي كانت اكثر تأثيراً من التركيز الواطئة اذ كان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة 5, 2, 3, 3 و 13 حزمة عند التراكيز 25 %، 50%، 100%، 150% و 200% على التوالي

جدول (11): الحزم المفقودة والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الخام لهلام

الصبار

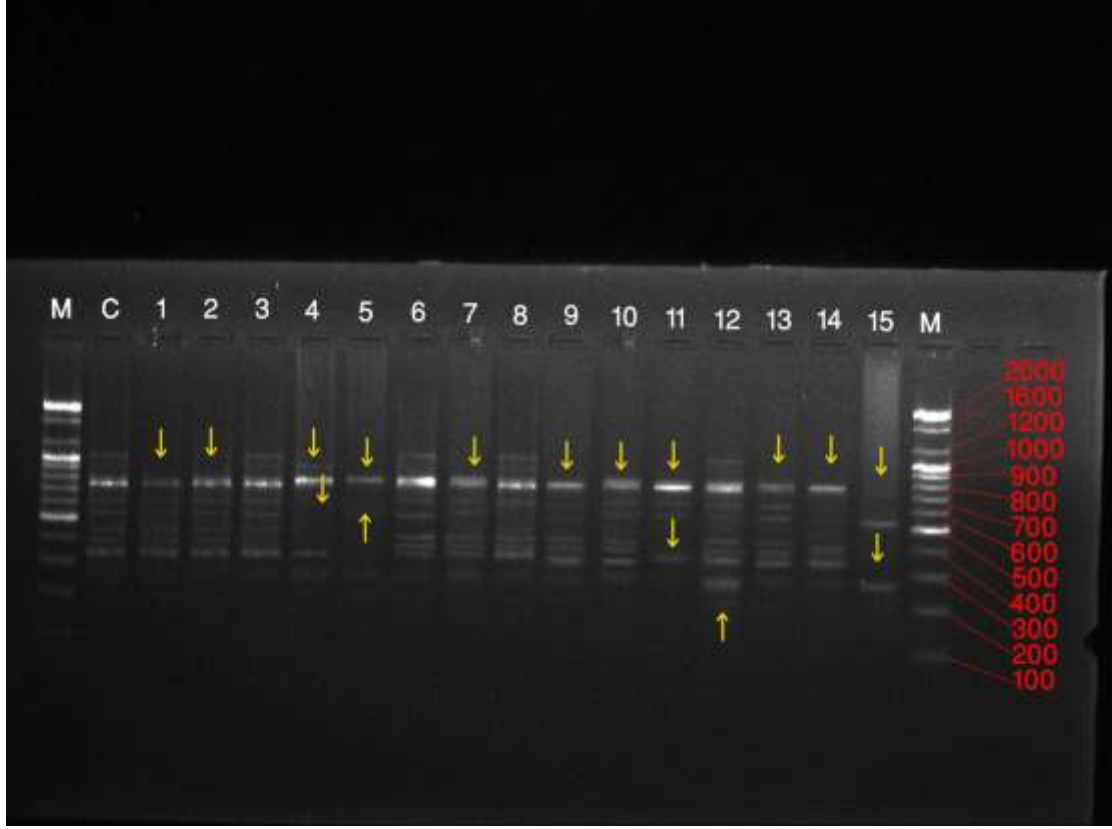
البيادئ	عدد حزم معاملة السيطرة	الحزم	التراكيز (%)				
			2	5	10	20	40
OPA-02	9	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	860 , 1025	860	0	498, 580 415,	, 860, 1025 373, 415 324,
OPA-3	5	اكتساب	0	0	0	0	431
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-4	7	اكتساب	0	0	0	1077	1077
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-7	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-8	7	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	341	341
OPA-9	4	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-10	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
المجموع	44		2	1	0	5	8

جدول (12): الحزم المفقودة والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي
لهلام الصبار

البيادئ	عدد حزم معاملة السيطرة	الحزم	التراكيز (%)				
			5	10	20	30	50
OPA-2	9	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	860 , 1025	0	860, 1025	860 , 1025
OPA-3	5	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-4	7	اكتساب	0	0	1077	0	0
		فقدان	0	0	0	0	649 , 1328 169,
OPA-7	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-8	7	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	1537	0	0	0
OPA-9	4	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-10	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
المجموع	44		0	3	1	2	5

جدول (13) : الحزم المفقوده والمكتسبة لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي
لهلام الصبار

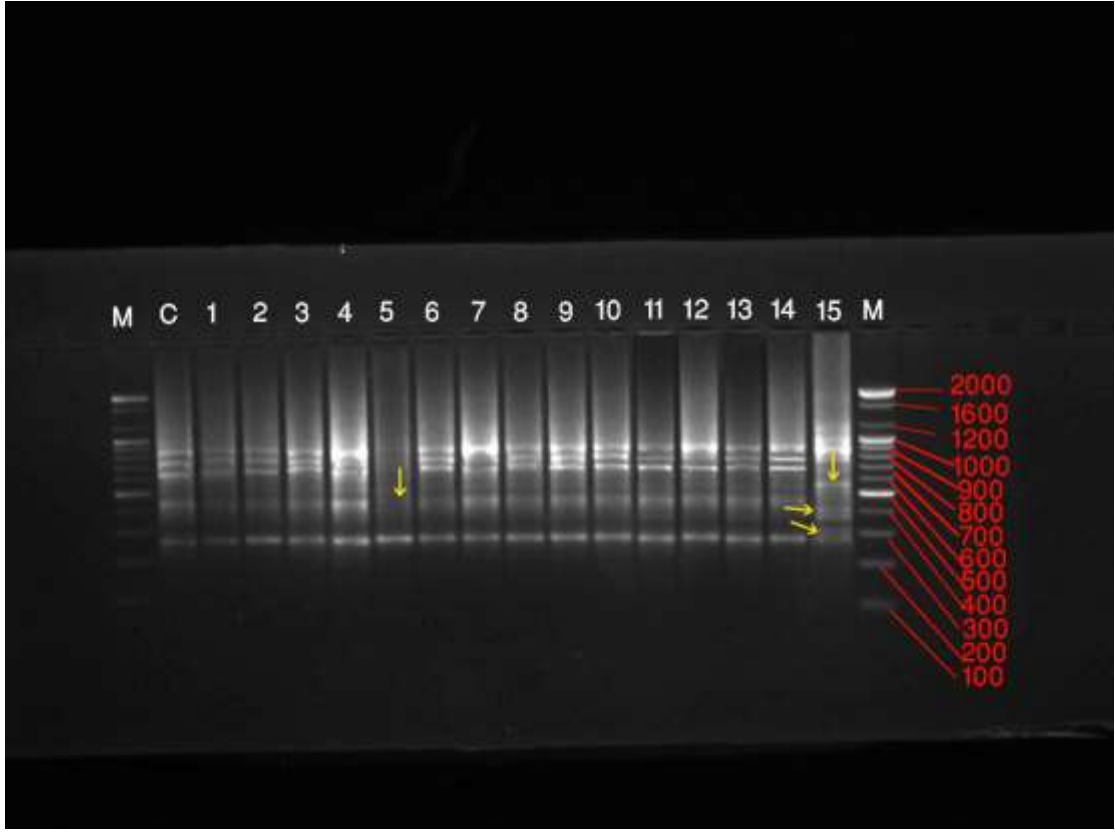
البيادئ	عدد حزم معاملة السيطرة	الحزم	التراكيز (%)				
			25	50	100	150	200
OPA-2	9	اكتساب	0	200	0	0	0
		فقدان	860 , 1025 415, 373,	0	860, 1025	860 , 1025	860, 1025 691, 704, , 373 , 415, 324
OPA-3	5	اكتساب	0	0	0	0	506, 989 344, 376,
		فقدان	0	0	0	0	431
OPA-4	7	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-7	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-8	7	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	1537	341	341	406	341
OPA-9	4	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
OPA-10	6	اكتساب	0	0	0	0	0
		فقدان	0	0	0	0	0
المجموع	44		5	2	3	3	13



شكل (17): نواتج تضاعف البادئ OPA-2 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder .

M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2% هلام الخام , 2- 5% هلام الخام , 3- 10% هلام الخام , 4- 20% هلام الخام , 5- 40% هلام الخام , 6- 5% كحولي , 7- 10% كحولي , 8- 20% كحولي , 9 - 30% كحولي , 10- 50% كحولي , 11- 25% مائي , 12- 50% مائي , 13- 100% مائي , 14- 150% مائي , 15- 200% مائي .

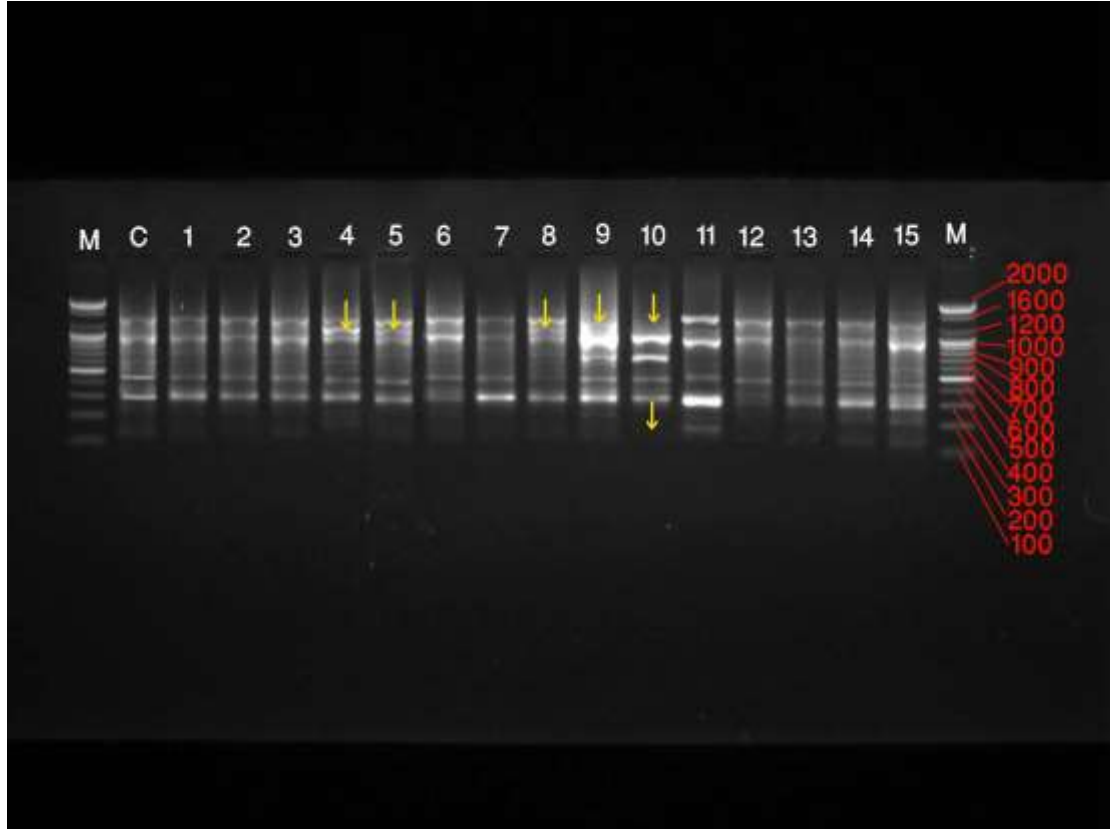
* تشير الاسهم الى اختفاء او ظهور حزم جديدة



شكل (18): نواتج تضاعف البادئ OPA-3 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder .

M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2% هلام الخام , 2- 5% هلام الخام , 3- 10% هلام الخام , 4- 20% هلام الخام , 5- 40% هلام الخام , 6- 5% كحولي , 7- 10% كحولي , 8- 20% كحولي , 9 - 30% كحولي , 10- 50% كحولي , 11- 25% مائي , 12- 50% مائي , 13- 100% مائي , 14- 150% مائي , 15- 200% مائي .

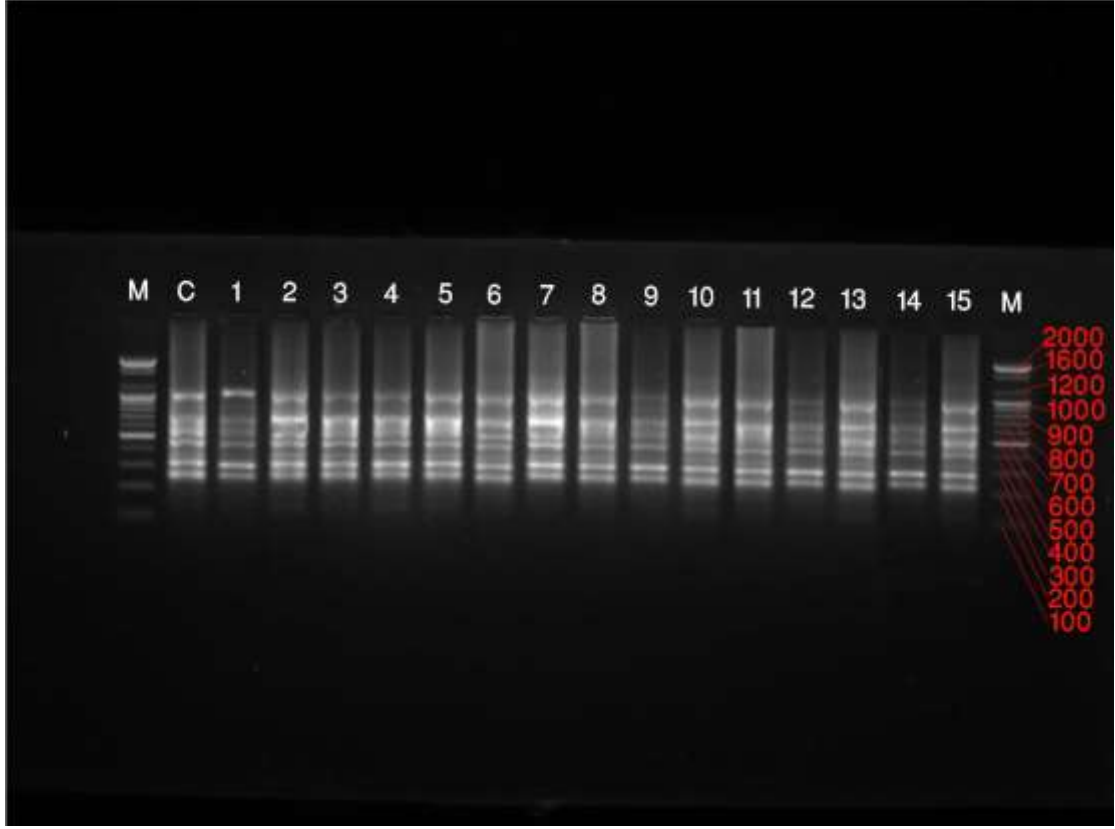
* تشير الاسهم الى اختفاء او ظهور حزم جديدة



شكل (19): نواتج تضاعف البادئ OPA-4 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder .

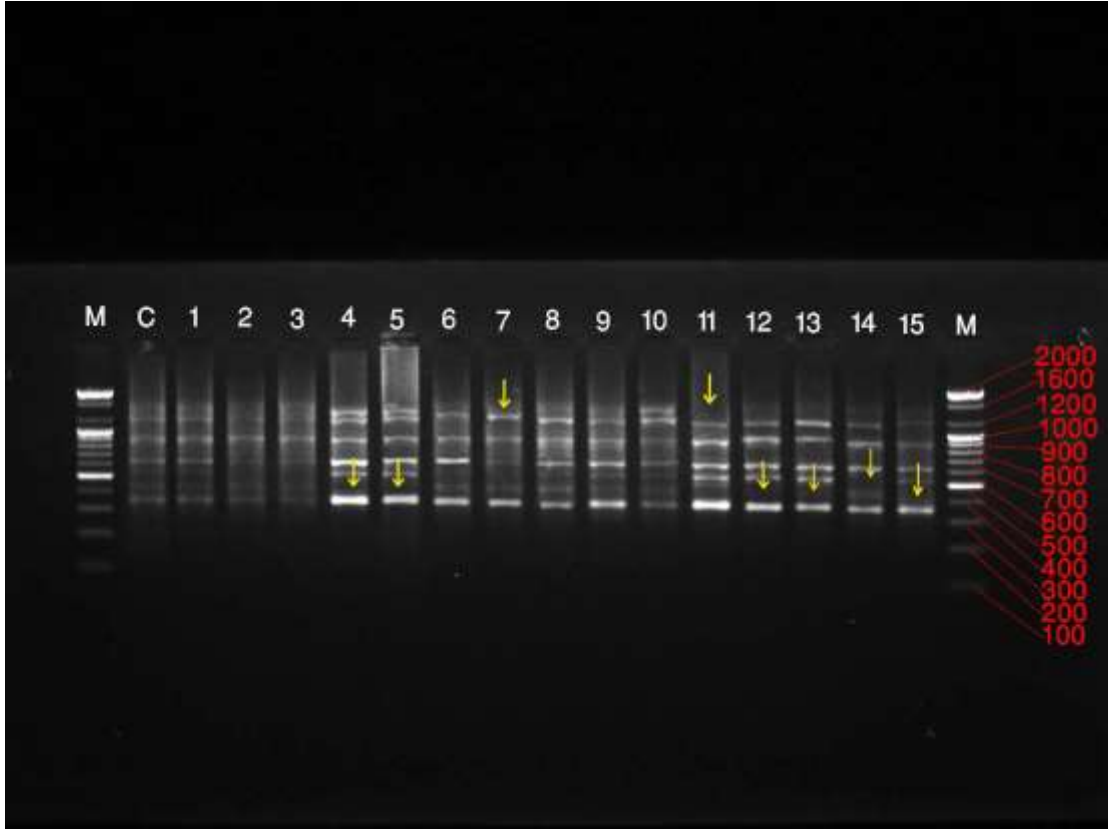
M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2% هلام الخام , 2- 5% هلام الخام , 3- 10% هلام الخام , 4- 20% هلام الخام , 5- 40% هلام الخام , 6- 5% كحولي , 7- 10% كحولي , 8- 20% كحولي , 9 - 30% كحولي , 10- 50% كحولي , 11- 25% مائي , 12- 50% مائي , 13- 100% مائي , 14- 150% مائي , 15- 200% مائي .

* تشير الاسهم الى اختفاء او ظهور حزم جديدة



شكل (20): نواتج تضاعف البادئ OPA-7 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5% مع الدليل الحجمي Ladder .

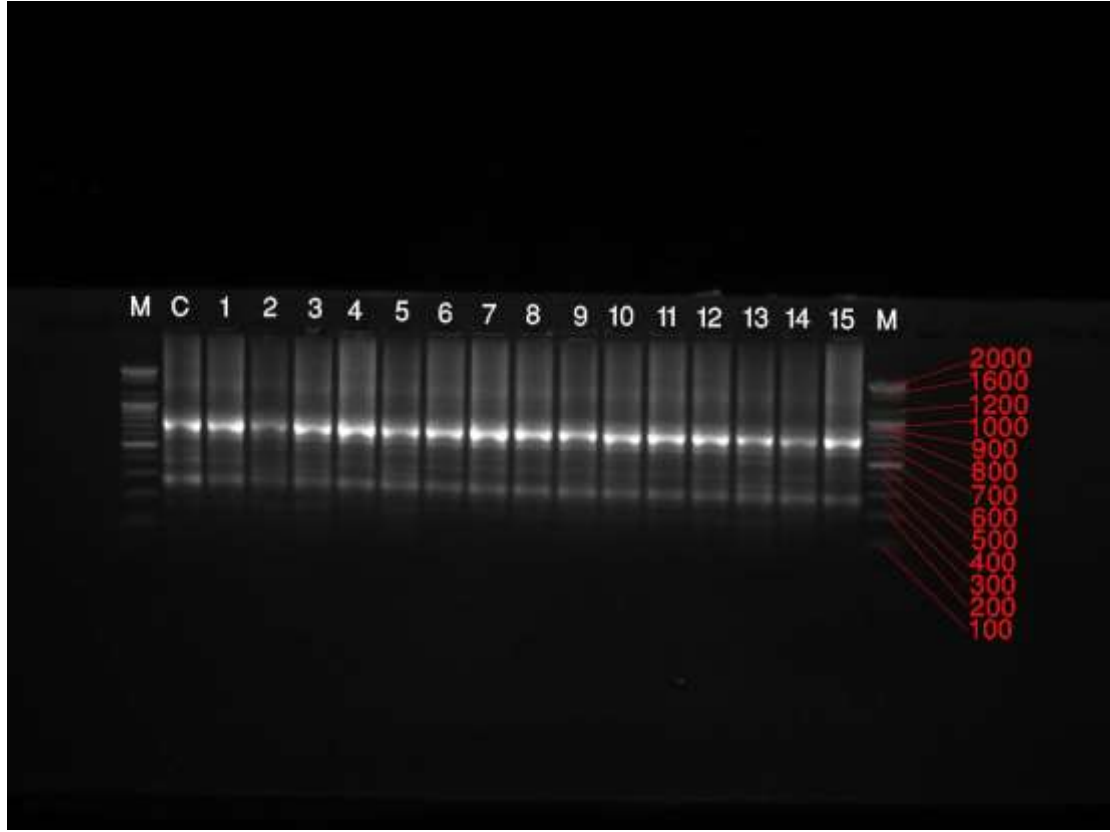
M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2% هلام الخام , 2- 5% هلام الخام , 3- 10% هلام الخام , 4- 20% هلام الخام , 5- 40% هلام الخام , 6- 5% كحولي , 7- 10% كحولي , 8- 20% كحولي , 9 - 30% كحولي , 10- 50% كحولي , 11- 25% مائي , 12- 50% مائي , 13- 100% مائي , 14- 150% مائي , 15- 200% مائي



شكل (21): نواتج تضاعف البادئ OPA-8 المرحلة على هلام الآكاروز 1.5 % مع الدليل الحجمي Ladder .

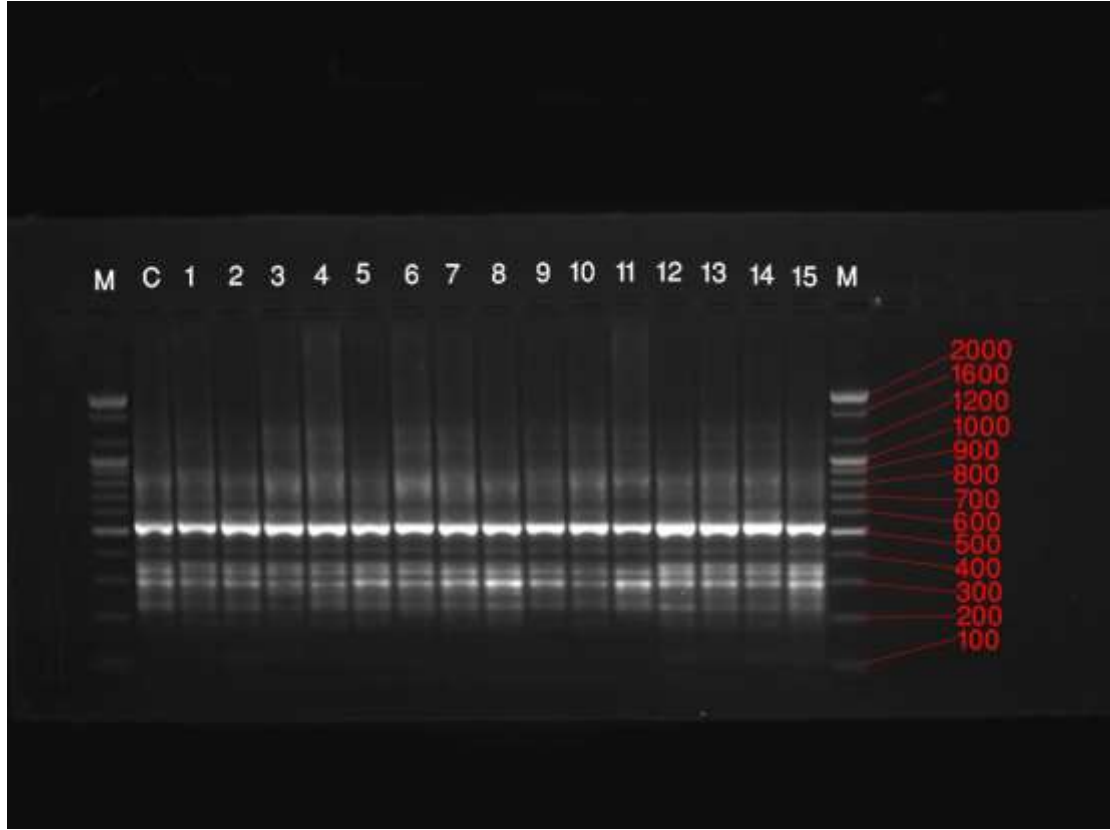
M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2 % هلام الخام , 2- 5 % هلام الخام , 3- 10 % هلام الخام , 4- 20 % هلام الخام , 5- 40 % هلام الخام , 6- 5 % كحولي , 7- 10 % كحولي , 8- 20 % كحولي , 9 - 30 % كحولي , 10- 50 % كحولي , 11- 25 % مائي , 12- 50 % مائي , 13- 100 % مائي , 14- 150 % مائي , 15- 200 % مائي .

* تشير الاسهم الى اختفاء او ظهور حزم جديدة



شكل (22): نواتج تضاعف البادئ OPA-9 المرحلة على هلام الآكاروز 1.5 % مع الدليل الحجمي Ladder .

M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2 % هلام الخام , 2- 5 % هلام الخام , 3- 10 % هلام الخام , 4- 20 % هلام الخام , 5- 40 % هلام الخام , 6- 5 % كحولي , 7- 10 % كحولي , 8- 20 % كحولي , 9 - 30 % كحولي , 10- 50 % كحولي , 11- 25 % مائي , 12- 50 % مائي , 13- 100 % مائي , 14- 150 % مائي , 15- 200 % مائي .



شكل (23): نواتج تضاعف البادئ OPA-10 المرحلة على هلام الأكاروز 1.5 % مع الدليل الحجمي Ladder .

M الدليل الحجمي , C السيطرة , 1 - 2 % هلام الخام , 2- 5 % هلام الخام , 3- 10 % هلام الخام , 4- 20 % هلام الخام , 5- 40 % هلام الخام , 6- 5 % كحولي , 7- 10 % كحولي , 8- 20 % كحولي , 9 - 30 % كحولي , 10- 50 % كحولي , 11- 25 % مائي , 12- 50 % مائي , 13- 100 % مائي , 14- 150 % مائي , 15- 200 % مائي .

2-3-1-4: تحديد نسبة الاستقرار الجيني Genomic template stability(GTS%)

دراسة التغيرات في انماط RAPD للعينات المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) مقارنة بمعاملة السيطرة من خلال قياس قيمة الاستقرار الجيني (Genomic template stability (GTS%) وهو مقياس نوعي يعكس التغيرات في تشكلات RAPD للعينات المعرضة لمستخلصات الصبار (جدول 14) .

يوضح جدول (14) بأن قيمة الـ GTS% لدينا جذور نبات البصل المعرض لمستخلصات هلام الصبار انخفضت بشكل واضح مقارنة بقيمة GTS% للجذور في معاملة السيطرة . وقد ازداد هذا الانخفاض في قيمة GTS% بشكل واضح عند التراكيز العالية من المستخلصات , اذ سجل اعلى انخفاض في قيمة % GTS للجذور المعرضة لمستخلص الهلام الخام عند تركيز 20% و التركيز 40% (التراكيز الاعلى من نصف المؤثر) اذ بلغت 91.16% و 85.12% على التوالي . اما قيمة GTS% في الجذور المعرضة للمستخلص الكحولي و المائي اذ كان اكبر انخفاض لقيمة GTS% عند التراكيز العالية , اذ سجل التركيز 50% من المستخلص الكحولي انخفاض شديد لقيمة GTS% اذ بلغت 90.78% , اما المستخلص المائي فأعطى التركيز 200% اعلى انخفاض لقيمة % GTS مقارنة بالتراكيز الاخرى اذ بلغت 72.56%.

جدول (14): نسبة الاستقرار الجيني %GTS في القمم النامية لجذور البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار.

المتوسط	OPA-010	OPA-09	OPA-08	OPA-07	OPA-04	OPA-03	OPA-02	عدد الحزم	بادئ
	6	4	7	6	7	5	9		
100	100	100	100	100	100	100	100	السيطرة	
96.83	100	100	100	100	100	100	77.78	%2	
98.41	100	100	100	100	100	100	88.89	%5	
100.00	100	100	100	100	100	100	100	%10	
91.16	100	100	85.71	100	85.71	100	66.67	%20	
85.12	100	100	85.71	100	85.71	80	44.44	%40	
100.00	100	100	100	100	100	100	100	%5	
94.78	100	100	85.71	100	100	100	77.78	%10	
97.96	100	100	100	100	85.71	100	100	%20	
96.83	100	100	100	100	100	100	77.78	%30	
90.78	100	100	100	100	57.71	100	77.78	%50	
93.21	100	100	85.71	100	100	100	66.67	%25	
96.36	100	100	85.71	100	100	100	88.78	%50	
94.78	100	100	85.71	100	100	100	77.78	%100	
94.78	100	100	85.71	100	100	100	77.78	%150	
72.56	100	100	85.71	100	100	0	22.22	%200	

3-3-1-4: مخطط التحليل العنقودي (شجرة القرابة) لعينات البصل *Allium cepa* اعتماداً على نتائج تقانة الـ RAPD

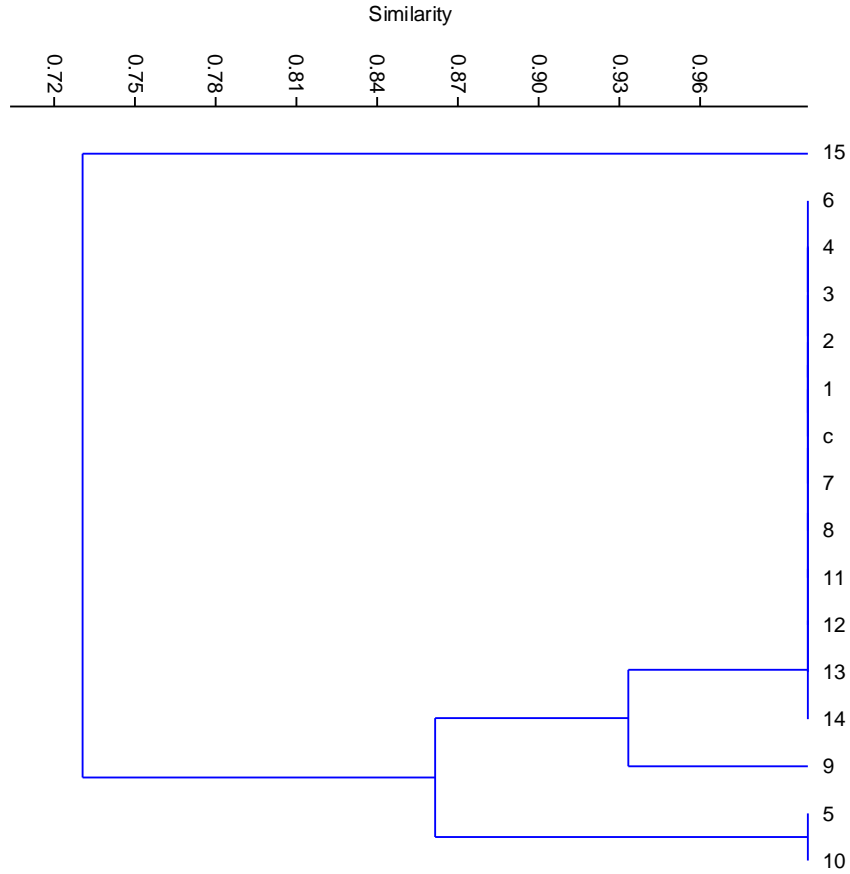
حصل على شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على النتائج التي تم التوصل إليها من استعمال البودائ العشوائية لتقانة RAPD على عينات البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار وكذلك على عينة السيطرة (ماء مقطر) و باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي . يتضح من الشكل (24) بأن العينات أُدرجت ضمن التحليل العنقودي في مجموعتين رئيسيتين :

المجموعة الاولى : ضمت عينة البصل المعرضة لتركيز 200% (اعلى من التركيز نصف المؤثر) من المستخلص المائي لهلام الصبار.

المجموعة الثانية : ضمت اثنتين تحت مجموعة :

- تحت المجموعة الاولى : ضمت عينة البصل المعرضة لتركيز 40% (3X EC50%) من مستخلص الهلام الخام , وعينات البصل المعرضة لتركيز 50% (2.5X EC50%) من المستخلص الكحولي .
- تحت المجموعة الثانية : ضمت معاملة السيطرة و عينات البصل المعرضة لتركيز 2% , 5% , 10% و 20% من المستخلص الخام , وكذلك عينات البصل المعرضة لتركيز 5% , 10% , 20% و 30% من المستخلص الكحولي و اخيراً عينات البصل المعرضة لتركيز 25% , 50% , 100% و 150% من المستخلص المائي للصبار .

يتضح مما سبق بأن العينات المعرضة للتركيز العالية جداً 200% من المستخلص المائي , 40% من المستخلص الخام و 50% من المستخلص الكحولي قد انعزلت في مجاميع منفردة عن العينات المعرضة للتركيز الاخرى وعن عينة السيطرة .



شكل (24): شجرة القرابة الوراثية لعينات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار .

C السيطرة , 1 - 2% هلام الخام , 2- 5% هلام الخام , 3- 10% هلام الخام , 4- 20% هلام الخام , 5- 40% هلام الخام , 6- 5% كحولي , 7- 10% كحولي , 8- 20% كحولي , 9 - 30% كحولي , 10- 50% كحولي , 11- 25% مائي , 12- 50% مائي , 13- 100% مائي , 14- 150% مائي , 15- 200% مائي .

2-4: المناقشة

1-2-4: تأثير مستخلصات هلام الصبار في متوسط طول جذور نبات البصل

يعد استعمال النظام النباتي من النظم الحيوية المهمة لدراسة الاثار السمية للعديد من المركبات والنباتات الطبية وعلى المستويين الخلوي والجزيئي (Grant, 1999) اذ تقدر السمية الوراثية بنظام القمم النامية لنبات البصل من خلال متابعة التأثيرات في نمو و مورفولوجية الجذور فضلاً عن متابعتها خلويًا او على مستوى المورثات . وان وجود تأثير لهذه المركبات على النظم النباتية يشير الى وجود مخاطر مباشرة او غير مباشرة في الكائنات الحية (Fiskesj, 1988) .

يعرف التركيز نصف المؤثر EC 50% بأنه التركيز الذي يثبط 50% من متوسط طول الجذور في العينات المعرضة للمواد السامة مقارنة بمعاملة السيطرة (Fiskesj, 1985) ويعد التركيز نصف المؤثر مقياس كميًا اولياً لتقييم التأثيرات السمية من خلال دراسة تأثير هذه المواد في احداث تشوهات او تغيرات وراثية (Tedesco and Laughinghouse, 2012) . يعد الجذر اكثر الاجزاء النباتية حساسية لتغيرات الظروف البيئية وذلك لانه في تماس مباشر مع المحيط وان تأثير المادة السامة يمكن ملاحظتها مباشرة من خلال متابعة متوسط طول الجذور (Fiskesj, 1993) .

اوضحت النتائج بأن مستخلص الهلام الخام للصبار كان تأثيره كبيراً في متوسط طول جذور نبات البصل اذ كان التركيز نصف المؤثر 10% . وجد في دراسة سابقة على المستخلص الخام لهلام الصبار المزروعة في تركيا بأن التركيز نصف المؤثر في متوسط طول الجذور كان 20% (İlbas et al., 2012) . يتضح من النتائج كذلك بأن مستخلص الهلام الخام في التركيز 40% ادى الى توقف كامل في نمو الجذور وقد يعود السبب الى ان هذا التركيز من المستخلص أدى الى حدوث تلف تام للنسيج وموت مبرمج للخلايا Apoptosis (Cenkci et al., 2010a) . تتشابه هذه النتيجة مع الدراسة التي توصل اليها Olusegun et al. (2010) . اذ وجد بأن معاملة جذور البصل بـ30% من مادة Textile effluent نفايات معامل غزل النسيج ادى الى موت تام للخلايا .

بلغ التركيز نصف المؤثر الـ EC50% للمستخلص الكحولي فكان 20% و للمستخلص المائي 100% , وهذه النتيجة تعني بأن المستخلص الكحولي كان تأثيره السام ضعف تأثير المستخلص المائي ان هذا الاختلاف في التأثير قد يعود الى تأثير مادة الكحول وقابليتها على

استخلاص المركبات الفعالة اكثر من الماء اذ للكحول القابلية على استخلاص المواد القلوية ,
الفينولات , الفلافينويدات والعديد من المركبات الاخرى . وتتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج
هميم (2003) وابو مجداد (2005) في كفاءة الكحول في استخلاص المركبات الفعالة اكثر من
الماء . اما السمية العالية للمستخلص الخام لهلام الصبار فقد يعود الى ظروف الاستخلاص اذ تم
استخلاصه مباشرة ولم تستغرق مدة استخلاصه وقتاً طويلاً. ذكر Chandegra and
Varshney (2013) بأن كفاءة مستخلصات الصبار تتأثر بعاملين مهمين هما المدة التي
استغرقتها عملية الاستخلاص ودرجة حرارة الخزن .

4-2-2: تأثير مستخلصات هلام الصبار في فعالية الانقسام المايوتوزي للخلايا المرستيمية لجذور البصل

4-2-2-1: تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الانقسام MI%

يعد دليل الانقسام المايوتوزي مقياساً يسمح بتقدير تكرار الانقسام الخلوي
(Marcano *et al.*, 2004). وغالباً ما يتم الاعتماد على دليل الانقسام للكشف عن السمية
الوراثية لجميع الكائنات الحية (Linnainmaa *et al.*, 1978) .

يتضح من نتائج هذه الدراسة بأن مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي)
أدت الى انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في نسبة دليل الانقسام MI% مقارنة بمعاملة السيطرة
ولجميع التراكيز المستعملة وضمن المدد الزمنية , وكانت العلاقة عكسية بين تركيز
المستخلصات ودليل الانقسام . تتفق هذه النتائج مع دراسات سابقة عن الصبار
(İlbas *et al.*, 2012) ومع العديد من المستخلصات النباتية الاخرى كالمستخلص المائي
المستخلص (*Marjori et al.*, 2002) *Bauhinia canolican* , *Maytenu ilicifolia*
القلويدي الخام لنبات المديد (*Convulvulus arvensis* (السعدي , 2008) , المستخلص
اوراق نبات الحرمل (Baeshin *et al.*, 2009)) و نبات زنباق المطر البيضاء
Zephyranthes candida (الانصاري واخرون , 2010) .

اوضحت النتائج كذلك بان نسبة دليل الانقسام لم يتأثر معنوياً بمدد التعريض المختلفة
24, 48 و 72 ساعة وقد يعود الى قصر مرحلة الانقسام المايوتوزي Mitotic phase . تتفق
هذه النتيجة مع كل من *İlbas et al.* (2012) الذي درس تأثير المستخلص الخام لهلام الصبار
على القمم النامية لجذور نبات البصل وكذلك مع دراسة *Marcano et al.* (2004) الذي

استعمل مادة Maleic hydrazide وبتراكيز ومدد تعريض مختلفة على جذور نبات البصل , بينما Palanikumar *et al.* (2011) اوضح ان مادة Aloin , المادة الفعالة في هلام الصبار , تعتمد مدى سميتها الخلوية على تركيز المادة ومدة التعريض ايضاً .

ان انخفاض دليل الانقسام الخلوي الى 22% او دون ذلك من معاملة السيطرة فانه يسبب تأثيرات مميتة Lethal effect للكائن الحي (Antonsie-wiez,1990). اما انخفاض دليل الانقسام الخلوي الى 50% او دون ذلك فانه ذات تأثير شبه مميت (وتدعى هذه النسبة حد السمية الخلوية Cytotoxic threshold) (Sharma ,1983), لذا فان مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) تعد سامة وذلك لخفضها دليل الانقسام بشكل معنوي ولاكثر من 50% . اوضحت النتائج بأن هلام الصبار الخام كان شبه مميت عند التركيز 10% اما المستخلص الكحولي عند تركيز 20% و المستخلص المائي فكان عند التركيز 150% وذلك لان هذه التراكيز أدت الى خفض نسبة دليل الانقسام MI % الى 50% تقريباً من معاملة السيطرة , لذا يمكن عد المستخلص الخام اكثر سمية ثم يليه المستخلص الكحولي ثم المائي . ان التراكيز العالية من المستخلصات ولاسيما مستخلص الهلام الخام 40% كان ساماً ومميتاً بشكل كامل للخلايا وادى الى موت Apoptosis وهذه النتيجة مشابهة لدراسة Olusegun *et al.* (2010) اذ وجد ان معاملة جذور البصل بـ 30% من مادة Textile effluent أدى الى موت تام للخلايا.

تؤكد نتائج هذه الدراسة على وجود علاقة قوية بين التركيز نصف المؤثر لمتوسط طول جذور البصل (EC50%) وقيمة دليل الانقسام (MI%) , اذ ان قيمة EC50% للمستخلصات (الخام والكحولي) خفضت قيمة MI% الى النصف لذا يمكن عد هذه القيم مؤشراً جيداً لتقييم سمية المستخلصات النباتية وتتفق هذه النتيجة مع Mustafa and Arikean (2008).

يعود سبب انخفاض نسبة دليل الانقسام في جذور البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار الى ان مستخلصات الصبار قد سببت تثبيطاً في تكاثر الخلايا , او قد يعود الى تثبيط تخليق الدنا /البروتين في الانظمة الحيوية (Danhof and McAnally, 1983; Avila *et al.* , 1997; Schulze and Kirscher ,1996) , ووضح El-Ghamery *et al.* (2000) الى ان سبب الانخفاض قد يعود الى حصول تأخير في مرحلة النمو الاول G1 من دورة الخلية مما يؤدي الى تقليل تصنيع الحامض النووي , او قد يعود سبب هذا الانخفاض الى ان مستخلص الصبار تداخل مع تطور الانقسام المايوزي لذا يمنع عدداً من الخلايا من الدخول الى الطور التمهيدي ويعطل دورة الانقسام خلال الطور البيني وقد يعود الى زيادة في زمن طورى البناء S

و مدة النمو الثانية G2 (Badr and Ibrahim, 1987; Webester and Davidson 1968 ; Van, 1969), ومن جهة اخرى ذكر Epel (1963) ان متوسط الانقسام المايوتوزي يتأثر بشكل كبير بمستوى ATP الناتج لذا فان مستخلصات هلام الصبار قد اثرت على المسارات التنفسية مما سبب انخفاضاً في مستوى انتاج المركبات الحاوية على الطاقة والمركبات الاساسية الاخرى مثل ATP, سكريات و جزيئات البروتين .

4-2-2-2: تأثير مستخلصات هلام الصبار في دليل الاطوار

جميع خلايا حقيقية النواة Eukaryotic cells تمر عند تضاعفها بسلسلة من الاحداث التي تؤدي الى انقسامها وتكوين خليتين مشابهة للخلية الأم . وتضم دورة الخلية عدة أطوار هي طور الـ G1, طور الـ Synthesis, طور الـ G2 و طور الانقسام الميوتوزي Miosis وهي المدة التي يتم فيها انقسام الخلايا التي تضاعفت مادتها الوراثية الى خلايا مماثلة للخلية الام في المادة الوراثية كماً ونوعاً والانقسام المايوتوزي M يشمل عدة اطوار : الطور التمهيدي Prophase, الطور الاستوائي Metaphase, الطور الانفصالي Anaphase و الطور النهائي Telophase (Becker et al.,2003).

بينت نتائج الدراسة الحالية انخفاض دليل الطور التمهيدي بشكل معنوي في خلايا جذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار مقارنة بمعاملة السيطرة و اظهرت النتائج كذلك ارتفاع دليل الطور الاستوائي في خلايا جذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار الثلاثة . حققت هذه النتيجة العلاقة العكسية المتوقعة بين دليل الطور التمهيدي ودليل الطور الاستوائي اذ ان الزيادة في نسبة أحدهما تكون على حساب الطور الثاني (El-Bayoumi et al., 1979) . ان الزيادة في عدد خلايا الطور الاستوائي او ما يدعى Metaphase poisoning اي بقاء الخلايا في الطور الاستوائي , وتأخر انتقالها الى الطور الانفصالي قد يعود سببه الى احتواء مستخلصات الصبار المدروسة على مركبات لها فعالية مضادة للنيبيبات الدقيقة وكذلك بلمرة التيوبوليولين التي تكون خيوط المغزل لذلك تفشل الكروموسومات في اكمال اصطافافها في الصفيحة الاستوائية ومن ثم تأخر الانقسام الخيطي في مرحلة الانتقال بين الاطوار الاستوائي و الانفصالي (Soliman, 2001) او قد يكون لها تأثير في تكوين وتوزيع خيوط المغزل وايقاف الانقسام الخلوي (Irana,2005) . تتفق نتائج هذه الدراسة مع دراسة السعدي (2013) الذي درست تأثير المستخلص المائي الخام لجذور نبات

الفجل على القمم النامية لجذور نبات البصل وسجلت ارتفاع عدد خلايا الطور الاستوائي على حساب الطور التمهيدي لجذور البصل المعرضة للمستخلص .

اما دليل الطور الانفصالي لخلايا جذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات الصبار فقد انخفضت معنوياً عند تركيز 20% من المستخلص الخام بعد 48 ساعة و تركيز 10% بعد 72 ساعة تعريض فضلاً عن تركيز 40% من الهلام الخام والذي عد تركيزاً قاتلاً تسبب في موت كامل للخلايا وايقاف تام للنشاط المايوتوزي اما دليل الطور النهائي فقد انخفض معنوياً عند تركيز 10% بعد 24 , 48 ساعة فضلاً عن التركيز القاتل 40% . وقد يعود السبب في انخفاض دليل طوري الانفصالي و النهائي الى احتباس الخلايا في الطور الاستوائي ومن ثمَّ انخفاض نسبة الخلايا التي تدخل في الطور الانفصالي و النهائي . تتفق نتائج هذه الدراسة مع كل من *Ilbas et al.* (2012) الذين دراسو التأثير السمي الوراثي لمستخلص الهلام الخام لنبات الصبار وكذلك مع الانصاري واخرون (2010) الذين درسو التأثير السمي الوراثي لنبات زنابق المطر البيضاء *Zephyranthes candida* بتراكيز ومدد مختلفة في جذور نبات البصل .

4-2-2-3:التشوهات الكروموسومية

يعد الشذوذ الكروموسومي الذي تسببه بعض المواد الكيميائية الدليل الحقيقي للتسمم الوراثي لتلك المركبات (Grant,1992) , اذ يمثل اختبار الشذوذ الكروموسومي في الانظمة النباتية تقنية بسيطة وواقعية لتعيين السمية الوراثية للمواد (Chandra et al ., 2005; Amer and Ali,1974).

يتضح من نتائج هذه الدراسة ان مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) أدت الى احداث تشوهات كروموسومية لجميع التراكيز المستعملة وعند جميع مدد التعريض . كما أن زيادة تركيز المستخلص ومدة التعريض تؤدي الى زيادة في نسبة التشوهات الكروموسومية في خلايا جذور نبات البصل . تتفق هذه النتيجة مع العديد من الدراسات التي وجدت تشوهات كروموسومية عديدة في جذور نبات البصل المعرضة للمستخلصات النباتية كمستخلص نبات زنابق المطر البيضاء *Zephyranthes candida* (الانصاري واخرون 2010), ومستخلص اوراق نبات *Inula viscosa* (Tülay and Ozlem , 2010), ومستخلص *Azadirachta indica* (Akaneme and Amaefule, 2012) والمستخلص المائي الخام لجذور نبات الفجل *Raphanus sativus L.* (السعدي , 2013).

وجدت في هذه الدراسة انواع عديدة من التشوهات الكروموسومية نتيجة تعريض جذور نبات البصل الى تراكيز مختلفة من مستخلصات هلام الصبار كظهور اللزوجة الكروموسومية Stickiness, التشنت الكروموسومي Disturbances , الجسور الكروموسومية Bridge , كروموسومات الطور الاستوائي الكولشيسين C-mitosis , الكروموسومات المتأخر Vagrant فضلاً عن تشوهات كروموسومية اقل تكراراً كالشكل النجمي النهائي Star telophase, وقد كان ظهور اللزوجة الكروموسومية اكثر التشوهات تكراراً وقد يعود سبب ظهور هذا النوع من التشوهات الى اسباب عديدة فذكر Darlington and Mc-Leish (1951) بأن لزوجة الكروموسومات قد يعود سببها الى تكثف في خيوط الدنا وتماسك الياف الكروماتين بين الكروموسومات التي تؤدي الى ترابطات كروماتيدية ثانوية بين الكروموسومات (Chauhan *et al.*, 1998 ; Patel and Bhat , 1992) او قد تنتج بسبب خلل في وظائف البروتينات اللاهستونية المختصة في تنظيم الكروموسوم واللازمة لفصل الكروماتيدات وعزلها وقد يعود سبب تثبيط عمل هذه البروتينات الى طفرات في الجينات التركيبية المشفرة لهذه البروتينات (Turkoglu,2007) . اعتقد Li and Liu (1992) بأن ظهور الكروموسومات اللزجة تعكس السمية العالية للمواد المستعملة وعادة ما تكون هذه السمية ذات تأثير غير رجعي ومن المحتمل أنها تقود الى موت الخلية .

اما ظهور الجسور الكروموسومية فقد يعود الى الكسور الكروموسومية او التصاق وكسر واعادة اتحاد النهايات المكسورة . ان التصاق الكروموسومات يمنع انفصال الكروموسومات البنئية لذلك تبقى مرتبطة بوساطة الجسور (Badr *et al.* , 1992) او بسبب عدم اكتمال تضاعف الكروموسوم بسبب نقص في نشاط الانزيمات المشاركة في عملية التضاعف او قد يعود السبب الى تميع ولزوجة الكروموسومات وتأثير المواد المستعملة في تركيب ووظيفة البروتينات اللازمة لفصل الكروماتيدات (Bennet ,1977) .

الطور الاستوائي الكولشيسيني C-mitosis و تأخر الكروموسومات وفيه تنتشر الكروموسومات خلال السايكوبلازم ومن ثم تفقد قدرتها على تحرك الى الاقطاب و هذا الخلل الكروموسومي يعود سببه الى تعطيل جهاز الياف المغزل الذي يؤدي الى تأخر انقسام السنتروميير (Turkoglu,2007).

أدى استعمال مستخلصات الصبار الى ظهور كروموسومات متشنتة Disturbed chromosome ويعود سبب ظهورها الى ضعف جهاز المغزل الذي يسبب انتشار الكروموسومات بشكل غير منتظم في الخلية (Amer and Ali, 1974).

فضلاً عن ذلك فقد ظهرت تشوهات كروموسومية اقل تكراراً مثل Star telophase في قمم جذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات هلام الصبار وقد يعود سبب ظهورها هو لزوجة الكروموسومات (AL-Najjar and Soliman, 1980) او بسبب اضطراب في جهاز المغزل الذي يسمح بانتشار الكروموسومات بشكل غير منتظم داخل الخلية (Amer and Ali, 1974).

4-2-3: الدراسة الجزيئية

4-2-3-1: تقانة التضاعف العشوائي متعدد الاشكال للدنا (RAPD)

تعد تقانة التضاعف العشوائي RAPD من التقنيات الحديثة الأكثر استعمالاً في الكشف عن التغيرات في المجين او الخلل الذي يصيب الدنا وذلك بسبب سهولة هذه الطريقة وعدم حاجتها لكمية كبيرة من الدنا و تسمح بتحليل سريع لعدد كبير من العينات في وقت واحد , فضلاً عن استعمال البوادي عشوائية من دون معرفة مسبقة لتسلسلات الدنا القالب . ويمكن الكشف على مدى واسع من اضرار الدنا ابتداءً من الطفرات النقطية الى التغيرات الكبيرة بسبب Large rearrangements (Unyagar et al., 2006 ; Hagger et al., 2005).

اثبتت الدراسات السابقة كفاءة هذه الطريقة في الكشف عن التأثيرات السمية لبعض الملوثات البيئية كالمواد الثقيلة و المبيدات الحشرية والاشعة فوق البنفسجية والعديد من المعادن الثقيلة (Atienzar et al., 1999, 2000). تعد هذه التقانة حساسة في الكشف عن تلف الحامض النووي الدنا بسبب الطفرات اذ استعملت وبشكل فعال في الكشف عن التأثير السمي الوراثي الذي قد تسببه بعض المواد الكيميائية في موروث محدد (Al-Qurainy et al., 2010) وفي البكتريا والنبات والحيوان (Atienzar et al., 1999).

تشير نتائج هذه الدراسة بأن تقانة RAPD قد نجحت في الكشف عن السمية الوراثية لمستخلصات هلام الصبار , اذ اظهرت نتائج الدراسة الوراثية بأن مستخلصات الصبار (الخام , الكحولي و المائي) أدت الى حصول تغيير في تشكيلات الـ RAPD (RAPD profiles) من خلال فقدان او ظهور حزم جديدة مقارنة بمعاملة السيطرة (جدول 11, 12 و 13) وقد يعود سبب اختفاء الحزم من العينات المعاملة بالمستخلصات الى تلف الدنا (damage) مثل كسر في الشريط المفرد او المزدوج لحامض النووي (Cenkci et al., 2009b, 2010a, b),

او بسبب تغيرات بمواقع النيوكليوتيدات المتممة لتسلسلات البادئ التي قد تكون بسبب اعادة الترتيب (Liu *et al.*, 2009) Rearrangements . ان ظهور حزم جديدة قد يعود الى تغير في المواقع المتممة Oligonucleotide priming بسبب الطفرات (حدوث اتحادات جديدة , حدوث حذف كبير large deletions , اعادة اتحادات متماثلة homologous recombinations) (Atienzar *et al.*, 1999) .

نسبة الاستقرار الجيني %GTS Genomic template stability هو مقياس نوعي يعكس التغيرات التي تحصل في اشكال الـ RAPD , يستعمل للكشف عن السمية الوراثية لمختلف انواع الملوثات البيئية ويعكس مدى كفاءة نظامي التكرار والاصلاح في الكائن (Atienzar *et al.*, 1999) . ان القيمة العالية في %GTS تعني بان المجين اقل عرضة للاضرار بينما القيم المنخفضة للـ %GTS فتعني احتمالية اكبر للضرر في المجين . اوضحت النتائج بان قيمة %GTS قد انخفضت في العينات المعاملة بمستخلصات الصبار وازداد هذا الانخفاض بشكل ملحوظ في العينات المعاملة بالتراكيز العالية 40% , 50% و 200% للمستخلص الخام , الكحولي والمائي على التوالي مما يوضح النسبة العالية من الاضرار التي تصيب الدنا في هذه التراكيز لذا تعد هذه التراكيز سامة وراثياً . تتفق هذه النتائج مع كل من (Cigerci *et al.*, 2015; Baeshin *et al.*, 2009; Cenkci *et al.*, 2009a, b, 2010a, b; Atienzar *et al.*, 1999, 2000).

يتضح من النتائج بان تحليل اشكال الـ RAPD وبالاعتماد مع قيمة %GTS تعد اداة كفوءة في الكشف عن السمية الوراثية لمستخلصات الصبار والنااتجة من الاضرار التي تحدث بسبب هذه المستخلصات , وتساعد هذه الطرائق في التنبؤ بالمخاطر البشرية المحتملة من استعمال هذه المستخلصات والنااتجة من التأثير التطفييري لها .

بينت شجرة القرابة الوراثية انعزال العينات المعاملة بالتراكيز العالية من مستخلصات هلام الصبار 40% , 50% و 200% من المستخلص الخام , الكحولي والمائي على التوالي عن العينات الاخرى وعن معاملة السيطرة . وهذه النتائج مشابهة الى ما توصل اليه كل من (Baeshin *et al.* 2009) و (El-Tarras *et al.* 2013) اللذين درسو السمية الوراثية للمستخلص المائي لاوراق نبات الحرمل (*Rhazya stricta* (Decne) على جذور نبات البصل . وكذلك (Olorunfemi *et al.* 2014) الذين درسو السمية الوراثية لمياه الحنفية في

جذور نبات البصل. وكذلك Cigerci *et al.* (2015) الذين درسو التأثير السمي الوراثي لـ *Thermopsis turcica* في جذور نبات البصل .

Conclusions and Recommendations الاستنتاجات والتوصيات

1- الاستنتاجات

1- أدت مستخلصات هلام الصبار (الخام , الكحولي و المائي) الى تثبيط معنوي في متوسط طول جذور نبات البصل وقد ازداد التثبيط بزيادة التراكيز . ان المستخلص الخام لهلام الصبار كان الاكثر تأثيراً على متوسط طول جذور نبات البصل يليه المستخلص الكحولي ثم يليه المستخلص المائي لهلام الصبار , اذ كان التركيز نصف المؤثر EC 50% لمستخلص هلام الصبار الخام 10% وللمستخلص الكحولي 20% وللمستخلص المائي 100% .

2- أدت مستخلصات هلام الصبار الى خفض دليل الانقسام في جذور البصل المعرضة لهذه المستخلصات وازداد هذا الانخفاض بزيادة التراكيز , وعدت التراكيز 10% , 20% و 150% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي شبه مميتة وذلك لانها خفضت دليل الانقسام الى 50% تقريباً مقارنة بمعاملة السيطرة وعدت التراكيز الاعلى من 30% , 50% و 200% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي مميتة لانها خفضت دليل الانقسام الى 22% تقريباً من معاملة السيطرة .

3- سببت مستخلصات هلام الصبار انخفاضاً معنوياً في دليل الطور التمهيدي وارتفاعاً معنوياً في دليل الطور الاستوائي .

4- سببت مستخلصات هلام الصبار العديد من التشوهات الكروموسومية وزادت نسبتها مع زيادة التركيز ومدة التعريض وكانت اكثر التشوهات تكراراً هي اللزوجة الكروموسومية , الجسور الكروموسومية , التثنت الكروموسومي , التأخر الكروموسومي و الاستوائي الكولشيني.

5- بينت نتائج التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا DNA (RAPD) اختلافاً في عدد الحزم والاوزان الجزيئية لبعض حزم الدنا DNA مقارنة بمعاملة السيطرة ولاسيما في العينات المعرضة للتراكيز العالية من المستخلصات (اعلى من التركيز نصف المؤثر) . انخفضت قيمة الاستقرار الجيني %GTS بشكل ملحوظ في العينات المعاملة بالتراكيز العالية (اعلى من التركيز نصف المؤثر) من مستخلصات هلام الصبار مقارنة بمعاملة السيطرة لذا عدت هذه التراكيز ذات سمية وراثية .

6- بينت شجرة القرابة الوراثية انعزال العينات المعاملة بالتراكيز العالية من مستخلصات الصبار 40% , 50% و 200% من المستخلص الخام , الكحولي و المائي على التوالي عن العينات الاخرى وعن معاملة السيطرة .

2- التوصيات

- 1- نوصي بعدم استعمال هلام الصبار مع الغذاء بشكل عشوائي وبدون دراسات مسبقة وذلك لتأثيرها التطفيري على مادة الدنا DNA واحداثها تشوهات كروموسومية عديدة في جذور نبات البصل ولاسيما في التراكيز العالية .
- 2- اجراء دراسات اخرى لتقييم السمية الوراثية لهلام الصبار في نظم حياتية اخرى كالحيونات المختبرية واختيار التراكيز الملائمة لاستعملها بدون اضرار .
- 3- عزل وتنقية المواد الفعالة في هلام الصبار ودراسة تأثيراتها السمية على مختلف النظم البايولوجية .
- 4- استعمال طرق جزيئية اخرى في دراسة السمية الوراثية للصبار كتقانة Simple sequence repeat (SSR) .
- 5- اجراء المزيد من الدراسات لتقييم السمية الوراثية لمستخلصات النباتات الطبية الاخرى المستعملة بكثرة في الطب الشعبي .

المصادر

المصادر العربية

- ❖ ابو خطوة , يوسف .(1985). المبيدات الزراعية وطرق استعمالها . وزارة الزراعة والمياه , المملكة العربية السعودية , 99 صفحة .
- ❖ أبو زيد , الشحات نصر . (1986) . النباتات والاعشاب الطبية . مكتبة مدبولي , القاهرة , 496, صفحة .
- ❖ ابو مجداد , نجوى محمد جميل علي . (2005) . تقييم فاعلية بعض المستخلصات النباتية تجاه بعض الفطريات المسببة لداء الفطار السطحي – الجلدي . رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة البصرة , 165, صفحة.
- ❖ الانصاري , ندى عبد المجيد ; ياسين , ناهي يوسف و مهدي ,شيماء صباح .(2010) . تأثير المستخلص المائي لنبات زنايق المطر البيضاء *Zephyranthes candida* في انقسام خلايا القمة النامية في جذور البصل *Allium cepa* والخلايا اللمفاوية في الدم البشري المحيطي في الزجاج . المجلة العراقية للسرطان والطب . 3(1) : 76-70 .
- ❖ الحسني , خلود إبراهيم حسن و جلادت , محمد صالح جبرائيل .(2006) . إستخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الـDNA في تشخيص أصناف البطاطا المكثرة خارج الجسم . مجلة دهوك . 11 (1): 52-59 .
- ❖ السعدي , رشا عبد الكريم .(2013) . التأثير الخلوي الوراثي للمستخلص الخام لجذور نبات الفجل *Raphanus sativus L.* على خلايا القمم النامية لجذور نبات البصل . مجلة جامعة النهريين العلوم .16(1):12-19 .
- ❖ السعدي ,نمارق هادي منصور .(2008) . تأثير المستخلص القلويدي الخام لاوراق المديد *Convolvulus arvensis L.* في الأنقسام الخلوي . رسالة ماجستير ,كلية العلوم , جامعة بغداد , 117 صفحة .
- ❖ الشاوش , فتحي ; حامد , فيصل و العيسى , عماد .(2007) . دراسة التنوع الوراثي لبعض طرز الرمان في اليمن بإستخدام تحاليل الـRAPD . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية . 23 (2) : 219-231 .
- ❖ الغامدي , صالح ; الطاهر , عثمان أحمد والحسين , جعفر محمد .(1994) . مدخل علم الوراثة . دار المريخ للنشر , السعودية , 303 صفحة .

- ❖ الغيثار , هيلة بنت علي عبد العزيز .(2007). دراسة وراثية وسيتولوجية لبعض سلالات الذرة الشامية .رسالة ماجستير , كلية العلوم , جامعة الملك سعود , 193 صفحة.
- ❖ النعيمي ، جبار حسن .(2010).العلاج بأشجار وشجيرات الفاكهة والغابات .دار الحوراء , بغداد , العراق , 541 صفحة .
- ❖ هميم , سعد سلمان.(2003) . فعالية بعض المستخلصات النباتية ضد الممرضات الشائعة في اخماج الجلد الجرثومية . رسالة ماجستير , كلية التربية , جامعة البصرة , 67 صفحة.
- ❖ ستانسفيلد , وليم .(1969). الوراثة . ترجمة : عبد السلام علي زين العابدين وعبد التواب فتحي . دار ماكجرو هيل للنشر , نيويورك , 395 صفحة .

- ❖ Adams, M. D. ; Kelley, J. M. ; Gocayne, J. D.; Dubrick, M. ; Polymeropoulos, M. H. ; Xiao, H. ; Merrill, C. R. ; Wu, A. ; Olde, b. ; Moreno, R. F. ; Kerlavage, A. R. ; McCombie, W. R. and Veneter, J. C. (1991). Complementary DNA sequencing : expressed sequence tags and human genome project . Sci. 252: 1651-1656 .
- ❖ Agarry, O. O. ; Olaleye, M. T. and Bello-Michael, C. O. (2006) . Comparative antibacterial activity of *Aloe vera* gel and leaf . African J. Biotechnol. 12: 1413-1414 .
- ❖ Ajabnoor, M. A. (1990). Effect of *Aloes* on the blood glucose levels in normal and alloxan diabetic mice. J. Ethnopharmacol. 28: 215-220.
- ❖ Akaneme, F. I. and Amaefule, C. C. (2012). Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica* using the *Allium* test. J. of Med. Plants Res. 6(22):3898-3907.
- ❖ Al-Hadeithi, Z. S. M. (2012). Molecular characterization for Iraqi barley (*Hordeum vulgare*) varieties using random amplification polymorphic DNA technique . M.Sc. thesis, University of Baghdad , Iraq, pp.112
- ❖ Al-Najjar, R. and Soliman, A. S. (1980). Cytological effects of fungicides mitotic effects of vitavax 200 and dithane S-60 on wheat and two related species .Cytology. (45): 163- 168
- ❖ Al-Qurainy, F. ; Alameri, A. A. and Khan, S. (2010). RAPD profile for the assessment of genotoxicity on a medicinal plant *Eruca Sativa*. J. Med. Plants Res. 4(7): 579-586.
- ❖ Al-zahrani, N. H. ; Alamoudi, K. H. and Al-shamrani, S. M. (2012). Cytogenetic and molecular variation on *Vicia faba* treated with creatine monohydrate. Life Sci. J. 9(3):585-590

- ❖ Amar, S. and Resham, V. (2008). *Aloe vera*: a short review. Indian J. Dermatol.53(4):163- 166.
- ❖ Amer, S. M. and Ali, E. M. (1974). Cytological effects of pesticides vs effects of some herbicides on *Vicia faba*. Cytol. 39:633-643.
- ❖ Amer, S. (1965). Cytological effects of pesticides mitotic effects of N-methyl-1-naphthyl carbamate sevin. Cytology. 30 : 175-181.
- ❖ Amida, M. B. ; Yemitan, O. K. and Adeyemi, O. O. (2007). Toxicological assessment of the aqueous root extract of *Sansevieria liberica* gerome and labroy (Agavaceae). J. Ethnopharmacol.113 (1):171-175.
- ❖ Amusan, P. S. ; Dlamini, J. D. and Msonthi, M. L. P. (2002). Some herbal remedies from Manzini region . Swaziland. J. Ethnopharmacol. 79: 109-112.
- ❖ Antonsie-wiez, D. (1990). Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under inflow of ledakrin . Folia Histochemica Cytobiologica . 26: 79-96.
- ❖ Arnold, H. ; Koldosky, O. and Palanch, A. C. (2002). Medicinal and magical plants of southern Africa: an annotated checklist . National Botanical Institute, Pretori , 203 pp .
- ❖ Atienzar, F. A. ; Conradi, M. ; Evenden, A. J. ; Jha, A. N. and Depledge, M. H. (1999). Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in daphnia magna exposed to benzo[a]pyrene . Environ. Toxicol. Chem.18:2275–2282.
- ❖ Atienzar, F. A. ; Cordi, B. ; Donkin, M. E. ; Evenden, A. J. ; Jha, A. N. and Depledge, M. H. (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmate*. Aquat. Toxicol. 50:1–12.

- ❖ Avila, H. ; Rivero, J. ; Herrera, F. and Fraile, G. (1997). Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from *Aloe vera* (*Aloe Barbadensis* (Miller)) gel. *Toxicol. J.* 35: 1423-1430.
- ❖ Badr, A. ; Ghareeb, A. and El- Din, H. M. (1992). Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *Vicia faba* roots. *Egypt. J. Applied Sci.* 7: 457- 468.
- ❖ Badr, N. and Ibrahim, A. G. (1987). Effect of herbicide glean on mitosis chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems. *Cytology.*52: 293-302.
- ❖ Baeshin, N. A. ; Sabir, J. S. M. and Qari, S. H. (2009). Cytogenetic and molecular evaluations of genetic effects of leaf extract of *Rhazya stricta* (Decne) on *Allium cepa* root tip meristems. *Egypt. J. Genet. and Cytol.* 38: 73-83.
- ❖ Baumung, R. ; Simianer, H. and Hoffmann, I. (2004). Genetic diversity studies in farm animals a survey . *J. Anim. Breed. Genet.* 121:361-373
- ❖ Becker, W. M. (1986). *The world of the cell.* Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. New York,798pp .
- ❖ Becker, W. M. ; Kleinsmith, L. J. and Hardin, J. (2003). *The world of the cell.* 5th edition . Benjamin Cummings publishing company, Inc. New York, pp.802
- ❖ Bennet, M. D. (1977). Heterochromatin, aberrant endosperm nuclei and grain shriveling in Wheat-Rye genotypes. *Heredity.* 39: 411-419.
- ❖ Blumenthal, M. ; Gruenwald, J. ; Hall, T. and Rister, R. S. (1998) . *The complete German commission monographs.* Austin, Texas: American Botanical Council .111: 556-569.
- ❖ Botstein, D.; White, R. L.; Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism . *Am. J. Hum. Genet.* . 32: 314-331.

- ❖ Bouchey, A. and Gjerstad, Q. (1994). Chemical studies of *Aloe vera* juice . Postgraduate Med. J. 65:216-217 .
- ❖ Boudreau, M. D. (2006). An evaluation of biological and toxicological proprieties of *Aloe Barbandesis* (Miller) *Aloe vera* . J. Environ. Sci. Health. 24: 103-154.
- ❖ Caetano-Anolles, G. ; Basam, B. J. and Gresshoff, P. M. (1991) . DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio and Technol. J. 9: 553-557 .
- ❖ Can, A. ; Akev, N. ; Ozsoy, N. ; Bolkent, S. ; Arda, B.P. ; Yanardag, R. and Okyar, A. (2004). Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models . Biol. Pharmaceutical Bulletin J. 27: 694-8.
- ❖ Cenkci, S. ; Cigerci, H. ; Yildiz, M. ; Gzay, C.; Bozdog, A. and Terzi, H. (2010a). Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brosssica rapa* L. Environ . Exp. Bot. 67:467-473.
- ❖ Cenkci, S. ; Temel, M. ; Kargiog˘lu, M. and Dayan, S. (2009a) . Propagation of endangered *Thermopsis turcica* kit Tan, vural & k˘c˘k˘d˘k using conventional and in vitro techniques. Turk J. Biol. 33:327–333.
- ❖ Cenkci, S. ; Yıldız, M. ; Cig˘erci, I. H. ; Bozdog˘, A. ; Terzi, H. and Terzi, E. S. A. (2010b). Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in Bean seedlings using comet and RAPD assays. Ecotoxicol. Environ. Safe J. 73:1558–1564.
- ❖ Cenkci, S. ; Yıldız, M. ; Cig˘erci, I. H. ; Konuk, M. and Bozdog˘, A. (2009b). Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Chemosphere. 76:900–906.

- ❖ Chakaravarty, H. L. (1976). Plant wealth of Iraq , a dictionary of economic plant . Botany Directorate Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad, Iraq ,51pp.
- ❖ Chandegra, V. K. and Varshney, A. K. (2013). *Aloe vera* L. processing and products : a review . Int. J. Med. Arom. Plants . 3(4):492-506.
- ❖ Chandra, S. ; Shauhan, L. K. S. ; Murthy, R. C. ; Saxena, P. N. ; Pande, P. N. and Gupta, S. K. (2005). Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium cepa* . Sci. of Total Environ. 347: 4656-4652.
- ❖ Chandraker, S. K. ; Singh , P. and Pandey , B. (2014). Clastogenic effect of soft drink on root tip of *Allium cepa* . Int. J. Curr. Microbiol. Appli. Sci. 3(5): 200-206 .
- ❖ Chauhan, L. K. S. ; Saxena, P. N. ; Sundararaman, V. and Gupta, S. K. (1998). Diuron induced cytological and ultrastructure alterations in the root meristem cells of *Allium cepa* . Pesticide Biochem. and Physiol. 62:152-163.
- ❖ Choi, S. ; Kim, K. W. ; Choi, J. S. ; Han, S. T. ; Park, Y. I. ; Lee, S. K. ; Kim, J. S. and Chung, M. H. (2002).Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. Plant Med. 68: 330-5.
- ❖ Choi, S. W. ; Son, Y. S. ; Park, Y. I. ; lee, S. k. and Chung, M. H. (2001) . The wound healing effect of a glycoprotein fraction isolated from *Aloe vera* . British J . Dermatol. 145 (4): 535-545 .
- ❖ Ciğerci, B.H. ; Cenkci, S. ; Kargıoğlu, M. and Konuk M. (2015). Genotoxicity of *Thermopsis turcica* on *Allium cepa* L. roots revealed by alkaline comet and random amplified polymorphic DNA assays. Cytotechnology. 10:1-10.

- ❖ Crouch, N. ; Symmonds, R. ; Spring, W. and Diederichs, N. (2006). Fact sheets for growing popular medicinal plant species, in Commercialising medicinal plants-A Southern African Guide, N. Diederichs, Ed., Sun Press, Stellenbosch , South Africa, pp 97–142
View at Google Scholar.
- ❖ Dahlberg, J. A. ; Zhang, X. ; Ehart , G. and Mullet, J. E. (2002). Comparative assessment of variation among *Sorghum* germplasm accessions using seed morphology and (RAPD) measurements. Crop Sci. 42: 291–296.
- ❖ Danhof , I. E. and Mc-Anally, B. H. (1983). Stabilized *Aloe vera*: effect on human skin cells. Drugs in the Cosmetics Industry. 133: 52-196.
- ❖ Darlington, C. D. and Mc-Leish , J. (1951). Action of malic hydrazide on the cell . Nature .167: 407-408.
- ❖ Davis, R. (1985) .Topical effect of *Aloe* with ribnucleic acid and vitamin C on adjuvant arthritis . J. Am. Pod. Med. Assoc. 76:61-66 .
- ❖ Davis, R. H. ; Stewart, G. J. and Bregman, P. J. (1992) . *Aloe vera* and the in famed synovial pouch . Mode. J. Am. Pod. Med. Assoc. 82: 140- 148.
- ❖ Dewey, W. C. and Miller, H. H. (1969). X-ray induction of chromatid exchanges in mitotic and G1 chinese hamster cell pretreated with colcemid. Exp. Cell Res. (57):63-70.
- ❖ Djeraba, A. and Quere, P. (2000). In *vivo* macrophage activation in chickens with acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera* . Inter J. Immunopharmacol. 22: 365-72.
- ❖ Dold, T. and Cocks, M. (2000). The *intelezi* plants of the eastern cape: traditional and contemporary medicines. Aloe. 37(1): 10-13.
- ❖ Duan, C. ; Jiang, X. ; Wen, C. and Wang, Y. (1998). Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba*

- micronucleus test . Environ. and Molecular Mutation. 426(2):121-125.
- ❖ Effraim, K. D. ; Jacks, T. W. and Sodipo, O. A. (2001). Histopathological studies on the toxicity of *Ocimum gratissimum* leaves extract on some organs of rabbit. African J. Biomed. Res. 6:21-25.
 - ❖ El-Bayoumi, A. S. ; Kabarity, A. and Habib, A. (1979). Cytological effects of papaverin hydrochloride on root tips of *Allium cepa* L. Cytology. 44: 745-755.
 - ❖ El-Ghamery, A. A. ; El-Nahas, A. I. and Mansour, M. M. (2000). The action of atrazine herbicide as an inhibitor of cell division on chromosomes and nucleic acids content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. Cytology. 55: 209-215.
 - ❖ El-Khodary , S. ; Habib, A. and Haliem, A. (1990). Effect of herbicide tribunal on root mitosis of *Allium cepa* .Cytology. 55:209-215 .
 - ❖ El-Tarras, A. A. E. ; Hassan, M. M. and El-Awady, M. A. M. (2013).Evaluation of the genetic effects of the in vitro antimicrobial activities of *Rhazya stricta* leaf extract using molecular techniques and scanning electron microscope. African J. of Biotechnol. 12(21):3171-3180.
 - ❖ Encyclopedia of Life (EOL).(2013).Species 2000 & ITIS catalogue of life . <http://eol.org/pages/1114576/names>
 - ❖ Epel, D. (1963). The effect of carbon monoxide inhibition on ATP level and the rate of mitosis in the sea urchin eggs . J. of Cell Biol. 17: 315-317.
 - ❖ Feily, A. and Namazi, M. R. (2009) . *Aloe vera* in dermatology: a brief review. G. Ital. Dermatol. Venereol . 144: 85-91.

- ❖ Fiskesj, G. (1985). The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring . *Hereditas* . 102: 99-112.
- ❖ Fiskesj, G. (1988). The *Allium* test-an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Muta. Res.* 197: 243–260.
- ❖ Fiskesj, G. (1993). The *Allium* test in wastewater Monitoring. *Environ. Toxicol. and Water Quality.* 8 (3): 291-298.
- ❖ Ghannam, N. ; Kingston, M. and Al-Mechaal, I. A. (1986). The antidiabetic activity of *Aloe vera* L, Juice.II.Clinical trail in diabetes mellitus patients in combinaison with glibenclamide . *Phytomedicine* . 3: 245-248.
- ❖ Grant, W. F. (1992). Cytogenetics studies of agricultural chemicals in plants in: genetic toxicology an agricultural perspective. Plenum Pres, Newyork. 335-378.
- ❖ Grant, W. F. (1978). Chromosome aberrations in plants as a monitoring system . *Environ. Health Perspect.* 27:37–43
- ❖ Grant, W. F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res-Fund. Mol. Mech.* 426:107–112 .
- ❖ Grindley, D. and Reynolds , T. (1986). The *Aloe vera* phenomenon : a review of properties and modern uses of the leaf parenchyma gel . *J. of Ethnopharmacol.* 16:112-151.
- ❖ Hagger, J. A. ; Atienzar, F. A. and Jha, N. A. (2005). Genotoxic, cytotoxic developmental and survival effects of treated water in the early life stages of the marine mollus , *Mytilus edulis* . *Toxicology.* 74:205-217.
- ❖ Haliem, A. S. (1993). Cytological effects of the herbicide sensor on mitosis of *Allium cepa* . *Egypt. J. Bot.* 33 (2) : 93-104.

- ❖ Hamman, J. H. (2008). Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules* . 13: 1599-1616.
- ❖ Hammer, Ø. ; Harper, D. A. T and Ryan, P. D. (2001). PAST: palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. 4(1):1-9.
- ❖ Harding, R. M. ; Boyce, A. J. and Clegg, J. B. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*. 132: 847-859.
- ❖ Hassan , G. M. and Yassein, A. A. M. (2014). Cytogenotoxicity evaluation of water contaminated with some textile azo dyes using RAPD markers and chromosomal aberrations of onion (*Allium cepa*) root cells . *Egypt. J. Genet. Cytol.* 43: 39-57
- ❖ Heggers, J. P. ; Robson, M. C. and Manavalen, K. (1996). Experimental and clinical observations on frostbite. *Annals Emergency Med.* 16: 1056-1062.
- ❖ Hu, J. and Quiros, L. F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10:505-511.
- ❖ Hutchings, I. and Robson, M. C. (1996). Zulu medicinal plants: an inventory. University of Natal Press, Pietermaritzburg, University of Zululand, Cape town, pp.450 .
- ❖ İlbas, A. İ. ; Gonen , U. ; Yilmaz, S. and Dadandi, M. T. Y.(2012). Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells . *Turk J. Bot.* 36(1): 263-268.
- ❖ Irana , K. (2005). Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents . *Curr. Med. Chem. Anticancer Agent* .5:29-46.
- ❖ Joseph, B. and Raj, S. J. (2010). Phytopharmacological and phytochemical properties of *Ficus* species: an overview. *Int. J. Pharm Biol. Sci.* 1: 246-253.

- ❖ Jyotsana, M. ; Sharma, A. K. and Ramnik, S. (2009). Fast dissolving tablets of *Aloe vera* gel . Tropical J. of Pharmaceutical Res. 8(1): 63-70.
- ❖ Kandil, A. and Gobran, W. (1982). Protection of gastric mucosa by *Aloe vera*. Bulletin of Islamic Med. 2: 503-511.
- ❖ King, G. K. ; Yates, K. M. and Greenlee, P. G. (1995). The effect of acemannan immunostimulant therapy spontaneous cannin and falien fibro sarcomas . J. Am. Arim. hosp .Assoc. 31:439 -447 .
- ❖ Konan, N. A. ; Bacchi, E. M. ; Lincopan, N. ; Varela, S. D. and Varanda, E. A. (2007). Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.) . J. Ethnopharmacol . 110:30-38.
- ❖ Konuk, M. ; Liman, R. and Cigerci, I. H. (2007). Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. Pakistan J. Bot. 39: 73-79.
- ❖ Kovalchuk, O. N ; Arkhipov, I. ; Telyuk, A. ; Hohn, P. and Kovalchuk, L. (1998) . The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the ukraine contaminated by the chernobyl accident. Muta. Res . 415:47–57
- ❖ Langmead, L. ; Makins, R. J. and Rampton, D. S. (2004). Anti-inflammatory effects of *Aloe vera* gel in human colorectal mucosa in vitro. Aliment Pharmacol. Therapy. 19: 521-527.
- ❖ Lawley, P. D. and Brookes, P. (1963). Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. Biochem. J. (89):137-138.
- ❖ Lawrence , G. P. (1996). The health and medical use of *Aloe vera* . The National College of Naturopathic Medicine , Life Sciences Press, Tacoma, pp. 77.

- ❖ Leme, D. M. and Marin-Morales, M. A. (2008). Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech.* 650:80–86
- ❖ Leung, M. Y. ; Liu, C. ; Koon, J. C. ; Zhu, L. F. ; Hui, Y. Z. ; Yu, B. and Fung, K. P. (2004). Macrophage activation by polysaccharide biological response modifier isolated from *Aloe vera* L. Var. *Chinensis* (Haw.) Berg . *Inter J. Immunopharmacol.* 14(6):501-10.
- ❖ Liman, R. ; Cigerci, I. H. ; Akyıl, D. ; Eren, Y. and Konuk, M. (2011) . Determination of genotoxicity of fenaminosulf by *Allium* and comet tests. *Pestic. Biochem. Phys.* 99: 61-64
- ❖ Linnainmaa, K. ; Meretoja, T. ; Sorsa, M. and Vainio, H. (1978). Cytogenetic effects of styrene oxide. *Muta. Res.* 58: 277-286.
- ❖ Liu, D. J. W. and Li, M. (1992). Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas.* 117: 23-29.
- ❖ Liu, W. ; Yang, Y. S. ; Li, P. J. ; Zhou, Q. X. ; Xie, L. J. and Han, Y. P. (2009). Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J. Hazardous Materials.* 161:878-883.
- ❖ Maenthaisong, R. ; Chaiyakunapruk, N. ; Niruntraporn, S. and Kongkaew, C. (2007). The efficacy of *Aloe vera* for burn wound healing: a systematic review. *Burns.* 33: 713– 718.
- ❖ Mahattanadol, H. (1996). Antigastric ulcer properties of *Aloe vera*. *Songklanakarin J. of Sci. and Technol.* 18: 49-57.
- ❖ Marcano, L. ; Carruyo, I. ; Del, C. A. and Montiel, X. (2004). Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94: 221-226.

- ❖ Marjori, L. C. ; Teixeira, R. O. ; Mantovani, M. S. and Vicentini, V. E. P. (2002) . Effects of maytenus ilicifolia mart and Bauhinia candicans benthinfusions on onion tip and rat bone marrow cells. Genet. and Molecular Biol. 25(1):85-89.
- ❖ Markert , C.L. and Moller, D. (1959). Multiple forms of enzymes: Tissue onto genetic and species patterns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 45: 753-763. (Abstract)
- ❖ Moon, E. J. ; Lee, Y. M. and Lee, O. H. (1999). A novel angiogenic factor derived from *Aloe vera* gel: beta- sitosterol, a plant sterol. Angiogenesis . 3: 117-123.
- ❖ Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155:335-50 .
- ❖ Mustafa, Y. and Arikan, E. S. (2008). Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Caryologia . 61(1): 45-52.
- ❖ Nagaoka, T. and Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and (RAPD) markers . Theor. Appl. Genet. 94: 597-602.
- ❖ Nakamura, Y. ; Leppert, M. ; Connell, P. ; Wolff, R. ; Holm, T. ; Culver, M. ; Martin, C. ; Fujimoto, E. ; Hoff, M. ; Kumlin, E. and White, R. (1987).Variable number tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping . Sci. 235: 1616-1622
- ❖ Nilan, R. A. (1978). Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens . Environ. Health Perspectives. (27):181-196.
- ❖ Nwafor, P. A. ; Egwu, G. ; Jahn, G. A. and Deis, R. P. (2007). Effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root on sexual behavior

and pituitary hormone secretion on waste rats during pregnancy and lactation . J. Ethnopharmacol. 113(3):492-497.

- ❖ Olorunfemi , D. I. ; Okieimen, E. A. and Ovwemuvwose, J. (2014) . DNA Integrity of onion (*Allium cepa* L.) root cells exposed to ballast water. Vasile Goldis University Press. 24(3): 305-309.
- ❖ Olusegun, S. B. ; Fidelia, O. I. and Peter, O. G. (2010). Cytogenotoxicity evaluation of tow industrial effluents using *Allium cepa* assay . African J. of Environ. Sci. Technol. 4(1) 21-27.
- ❖ Palanikumar, L. ; Ragunathan, I. and Panneerselvam, N. (2011). Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells. Turkish J. Biol. 35: 145-152.
- ❖ Panda, H. (2000). *Aloe vera* hand book cultivation, research findings, products, formulation, extraction and processing. Asia Pacific Business Press , India, pp. 469.
- ❖ Patel, B. C. and Bhat, T. G. I. (1992). A comparative study of MH and EMS in induction of chromosomal aberrations on lateral root meristem in *Clitorin termata* L. Cytology. 57: 259-264.
- ❖ Paterson, A. H. ; Tanskley, S. D. and Sorrell, M. E. (1991). DNA markers in plant improvement . Adv. Agron . 36:818-820 .
- ❖ Pelley, F. and Wang, H. (1993) . Chemical constituents in *Aloe vera* . J. Pharmacol. 47(2):73-77.
- ❖ Prince, J. P. ; Lackney, V. K. ; Angeles, C. ; Blauth, J. R. and Kyle, M. M. (1995). A survey of DNA polymorphism within the genus *Capsicum* and the fingerprinting of pepper cultivars. Genome . 38:224-231.
- ❖ Qari , S. H. M. (2009) . Detection of DNA damage in *Allium cepa* root cells after exposure to carbofuran using RAPD assay . Umm. Al-Qura Univ. J. App. Sci. 1(1):45-57 .

- ❖ Qari, S. H. M. (2010) . DNA-RAPD fingerprinting and cytogenetic screening of genotoxic and antigenotoxic effects of aqueous extracts of *Costus speciosus* (Koen). J. of King Abdulaziz Univ. Sci. 22: 133-152.
- ❖ Rady, A. A. M. (2001). Fingerprinting of maize inbred lines (*Zea mays* L.) using biochemical methods. Ph. D. thesis , Cairo Univ., Egypt , pp.108.
- ❖ Raghuvanshi, S. S. and Singh, A. K. (1976).Effect of gamma rays on growth and karyokinetic activity in *Trigonella foenum* L. Cytology. (41):177-186.
- ❖ Rank, J. (2003) . The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. Ecol. 1: 38-42.
- ❖ Renisheya, J. J. M. T. ; Johnson, M.; Beulah, N. S. ; Laju, R. S. ; Anupriya, G. and Renola, J. J. E. T. (2012) . Anti-bacterial and antifungal activity of *Aloe vera* gel extract. Inter J. Biomedical Adv. Res. 3(3):184-187.
- ❖ Reuter, J. ; Jocher, A. ; Stump, J. ; Grossjohann, B. ; Franke, G. and Schempp, C. M. (2008). Investigation of the anti-inflammatory potential of *Aloe vera* Gel (97.5%) in the ultraviolet erythema test. Skin Pharmacol. Physiol. 21: 106-110.
- ❖ Reynolds, T. and Dweck, A. C. (1999a). *Aloe vera* leaf gel :a review update . J. Ethnopharmacol. 68:3-37 .
- ❖ Reynolds, T. and Dweck, A. C. (1999b). *Aloe vera* leaf gel: a review up date. J. of Ethnopharmacol . 15: 3-37.
- ❖ Robert, A. ; Nezamis, J. E. ; Lancaster, C. and Hamchar, A. J. (1979). Cytoprotection by prostaglandins in rats. Gastroenterology 77: 433-443.
- ❖ Ruffa, M. J. ; Ferraro, G. ; Wagner, M. L. ; Calcagno, M. L. ; Campos R. H. and Cavallaro, L. (2002) . Cytotoxic effect of argentine

medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. J. Ethnopharmacol. 79:335–339.

- ❖ Sa, I. M. ; Oh, S. T. ; Song, S. ; Kim, M. R. ; Kim, D. S. ; Woo, S. S. ; Jo, T. H. ; Park, Y. I. and Lee, C. K. (2005) . Identification of optimal molecular size of modified *Aloe* polysaccharides with maximum immunomodulatory activity. Inter. Immunopharmacol. 5 : 271-9.
- ❖ Saito, H. ; Imanishi, K. and Okabe, S. (1989) . Effects of *Aloe* extracts, aloctin A, on gastric secretion and on experimental gastric lesions in rats. Yakugaku Zasshi . 109: 335-9.
- ❖ Sakai, T. ; Repko, B. M. ; Griffith, B. P. and Waters, K. M. V. (2006) . Infusion of a drag-reducing polymer extracted from *Aloe vera* prolonged survival time in a rat model of acute myocardial ischemia. British J. of Anaesthesia . 98 : 23-8.
- ❖ Saleem, R. ; Faizi, S. ; Siddiqui, B. S. ; Ahmed, M. ; Hussain, S. A. ; Qazi, A. ; Dar, A. ; Ahmad, S. I. ; Qazi, M. H. ; Akhtar, S. and Hasnain, S. N. (2001). Hypotensive effect of chemical constituents from *Aloe barbadensis*. Plant Med. 67: 757-60.
- ❖ Sax, K. (1932). The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics. 8: 552-560 .
- ❖ Sax, K. (1940). An analysis of x-rays induced ehromosomal aberrations in *Tradescantia*. Genetics. (25): 41-68.
- ❖ Saxena, P. N. ; Chauhan, L. K. S. and Gupta, S. K. (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage . Toxicology. 216: 244-252.
- ❖ Schulze, E. and Kirscher, S. (1996). Microtubule dynamics in interphase cells . J. of Cell Biol. 102: 1020-1021.

- ❖ Seth, C. S. ; Misra, V. ; Chauhan, L. K. S. and Singh, R. R. (2008) . Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 71:711–716.
- ❖ Sharma, C. (1983) . Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Curr. Sci.* 52: 1000-1002.
- ❖ Soliman , M. I. (2001) . Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica juss*) using the *Allium cepa* chromosomes aberration assay . *J. Biol. Sci.* 1:1021-1027.
- ❖ Sowemimo, A. A. ; Fakoya, F. A ; Awopetu, I. ; Omobuwajo, O. R. and Adesanya, S. A. (2007) . Toxicity and mutagenic activity of some selected Nigerian plants. *J. Ethnopharmacol.* 113(3):427-432.
- ❖ Steenkamp, V. and Stewart, M. J. (2007). Medicinal applications and toxicological activities of *Aloe* Products. *Pharmaceutical Biol.* 45: 411-420.
- ❖ Stepanova, O. S. ; Prudnick, N. Z. ; Soloviera, V. P. ; Golovchenko, G. A. ; Svischchuk, A. A. and Dubkova, O. M. (2007) . Chemical composition and biological activity of dry *Aloe* leaves. *Fiziologicheski Aktivnye Veshchestva* . 9: 94-97.
- ❖ Strickland , F. M . (2001) . Immune regulation by polysaccharides: implications for skin cancer . *J. of Photochem. and Photobiol.* 63: 132 -140 .
- ❖ Susan, A. (1997). Studies on cytological changes induced by muriat of potash in *Allium cepa*. *Cytologia*, 62: 291 – 294.
- ❖ Suvitayavat, W. ; Sumrongkit, C. ; Thirawarapan, S. S. and Bunyapraphatsara, N. (2004) . Effects of *Aloe* preparation on the histamine-induced gastric secretion in rats. *J. Ethnopharmacol.* 90: 239-247.

- ❖ Szulc , M. ; Zgorska , A. and Zimbinska , A. L. (2012) . PCR-RAPD optimization for hospital wastewater genotoxic influence analysis on *Allium cepa* root meristem cell. Architecture Civil Engineering Environ. J. 1(1) : 79-86 .
- ❖ Tai, H. T. and Tanksley , S. D. (1999) . A rapid and inexpensive method for isolation and total DNA dehydrated plant tissue . Plant Mol. Biol. Rep. 89:139-145 .
- ❖ Tanaka, M. and Matsuda, M. A. (2006) . Identification of five phytosterols from *Aloe vera* gel as antidiabetic compounds. Biol. Pharmaceutical Bulletin . 29: 1418-22.
- ❖ Tedesco, S. B. and Laughinghouse, H. D. I.V. (2012) . Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test, environmental contamination. Dr. Jatin Srivastava (Ed.), ISBN: 978-953-51-0120-8, InTech, DOI: 10.5772/31371. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-contamination/bioindicator-of-genotoxicity-the-allium-cepa-test>
- ❖ Tülay, A. C. and Ozlem, S. A. (2010). Evaluation of cytotoxicity of *Inula viscosa* extracts with *Allium cepa* test. J. Biomed Biotechnol. 2010:1-7.
- ❖ Turkoglu, S. (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* . Mut. Res. / Genetic Toxicol. and Environ. Mut. 626 (1-2):4 – 14.
- ❖ Unyagar , S. ; Celik , A. ; Cekic, F. O. and Gozel, A. (2006). Cadmium –induced genotoxicity , cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba* . Mutation. 21:77-81.
- ❖ Urch , D. (1999). *Aloe vera* the plant nutrients gift . Back down Publication , Bristol United Kingdom , 8-17 pp.

- ❖ Van, H. J. (1968) . The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristems. *Exp. Cell Res.* 51: 167-176.
- ❖ Vig, B. K. (1971). An increase induced by colchine in the incidence of somatic crossing over in glycine max. *Theor. Appl. Genet.* (41): 145-149.
- ❖ Vos, P. ; Hogers, R. ; Bleeker, M. ; Reijans, T. ; Vandeleee, T. ; Hornes, M. ; Frijters, A. ; Pot , J. ; Pelemanm, J. ; Kuiper, M. and Zabeau, M. (1995). AFLP : a new technique for DNA fingerprinting . *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414 .
- ❖ Webester, P. L. and Davidson, D. (1969). Changes in the duration of the mitotic cycle induced by colchicines and indolzyl acetic acid in *Vicia faba* roots. *J. Experimental Botany.* 20: 671-685.
- ❖ Weigand, F. ; Baum, M. and Udupa, S. (1993). DNA molecular marker techniques .*Inter Center for Agricultural Res. in the Dry Areas.* 20:1-10
- ❖ Welsh, J. and Mc-Clelland, M. (1990) . Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218 .
- ❖ Wexelsen, H. (1933) . Linkage between quantitative and qualitative characters in barley. *Hereditas.* 17: 323-341
- ❖ Wild, J. ; Waugh, R. and Powell, W. (1992) . Genetic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83:871-877 .
- ❖ Williams, J. G. ; Kubelik, A. R. ; Livak, K. J. ; Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.

- ❖ Williams, J. G. ; Reiter, R. S. ; Young, R. M. and Scolhik, P. A. (1993). Genetic mapping of mutations using phenotypic pools and mapped RAPD markers. *Nucl. Acids Res.* 21:75-95 .
- ❖ Winter, P. and Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World J. Microbial. Biotechnol.* 11: 438-448.
- ❖ Yates, K. M. ; Rosenberg, L. J. ; Harris, C. K. ; Bronstand, D. C.; King ,G. K. ; Bichle, G. A. ; Walker, B. ; Ford, C. R. ; Hall, J. E. and Tizard, I. R. (1992). Pilot study of effect of 77 acemannan in cats infected with feline immune deficiency virus . *Veterinary Immunol. and Immunopathol.* 35: 177-189
- ❖ Yu, C. S. ; Yu, F. S. ; Chan, J. K. ; Li, T. M. ; Lin, S. S. ; Chen, S. C. ; Hsia, T. C. ; Chang, Y. H. and Chung, J. G. (2006). Aloe-emodin affects the levels of cytokines and functions of leucocytes from sprague-dawley rats. In *Vivo.* 20: 505-9.
- ❖ Yusuf, S. ; Agunu, A. and Diana, M. (2004). The effect of *Aloe vera* berger (Liliaceae) on gastric acid secretion and acute gastric mucosal injury in rats. *J. Ethnopharmacol.*93: 33-7.
- ❖ Zhang , Land and Tizard , I. R. (1996) . Activation of mouse macrophage cell line by acemannan : the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel . *Immunopharmacol.* 35(2): 119-128 .

Abstract

Aloe vera L. is one of the important plants in the world .It is currently and widely used in pharmaceutical industry, and its gel in some time added to some foods all over the world. Therefore , the present study was conducted to evaluate the cytotoxic and genetic effects of crude, alcohol and aqueous extracts of *Aloe vera* gel toward the onion(*Allium cepa* L.) roots (as a biological system) exposure at different periods.

Onions roots were treated with different concentrations of the extracts : 2% , 5% , 10% , 20% and 40% (v/v)of the crud extract , 5%, 10% , 20% 30% and 50% (v/w) of alcohol extract and the concentration 25%, 50%, 100% ,150% and 200%(v/w) of aqueous extract of *Aloe vera* gel exposed for different period (24, 48 and 72) hour . The investigation were focused on the effect of these extracts on onions roots length rate and some cellular properties (mitotic index , phase index , the percentage and type of chromosome aberrations , as well as a genetic study using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) of onions roots treated with different concentration of this extracts .

Results showed that all *Aloe vera* gel extracts had inhibit activity toward onion roots length rate . The inhibition associated positively with the increasing concentration . The effective concentration (EC50%) were 10% of the crude extract , 20% of the alcoholic extract and 100% of aqueous extract , indicating the effectiveness of the crude extract followed by alcoholic extract and then the aqueous extract .

Cytological study showed that all *Aloe vera* gel extract revealed a significant decrease in mitotic index (MI%) of the onion roots cells compared with the control group , and the effect was positively associated with the increasing concentrations of the extract . However, the effect was independent on the exposure period . The concentrations

10%, 20% and 150% of the crude, alcohol and aqueous extract respectively indicated a reduction of the mitotic index to almost 50% of the control treatment . Therefore , this concentrations considered as sub-lethal concentrations for this extracts respectively while the higher concentrations than 30%, 50% and 200% of the crude, alcohol and aqueous extract which reduced the mitotic index to almost 22% of the control treatment were considered as lethal concentrations .

The results also showed a significant decreases in prophase and an increase in metaphase in onion roots cells treated with extracts comparison with control treatment . Many of chromosomal abnormalities were appeared due to the treatments of the onion roots with different concentration of the extracts ,the percent abnormalities was increased with the increasing concentration of the extract and exposure period . The most frequent of chromosome abnormalities were chromosomal stickiness, disturbed chromosome, chromosomal bridges, C-mitosis, vagrant chromosomes in addition to the other chromosomal abnormalities star telophase.

The toxicity effect of *Aloe vera* gel were studied on molecular level by using random amplification polymorphism of DNA(RAPD). Ten random primers were used, seven of them gave polymorphic bands in all the studied samples and their molecular weights were ranging from 100 to 1600 base pair.

The results of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) showed significant difference in the number of DNA band and their molecular weight of the onion roots treated with *Aloe vera* extracts compare to control treatment . The high concentrations(higher than EC50%) of extracts were showed to be more effective on the DNA

through the appearance or disappearance of larger number of DNA band in comparison with control . The genetic template stability (% GTS) was significantly decreased in DNA of onions root treated with high concentrations (higher than EC50%) of *Aloe vera* extracts, therefore the high concentrations of *Aloe Vera* extracts were considered to be genetically toxic.

The genetic dendrogram was obtained using Jaccard factor of genetic divergence and the result showed segregation of the samples treated with heights concentrations (%40 %200 and %50) of crude, alcohol and aqueous extract from other samples and control treatment. Therefore, the RAPD method can be considered as an efficient method in detecting for assessment of genotoxicity of crude , alcohol and aqueous extract of *Aloe vera* gel .



University of Baghdad

College of Education for Pure
Sciences (Ibn Al- Haitham)

Genotoxic effect of *Aloe vera* extract using molecular and cytogenetic markers

A THESIS

**Submitted to the College council of Education for Pure
Sciences / Ibn Al-Haitham**

**University of Baghdad in Partial Fulfillment of the
Requirement for the Degree of Master of Science**

In

Biology / Botany / Molecular Genetics

By

Ghaith Mundher Fadhil

B. Sc. Biology - College of Education for Pure Sciences

Ibn Al-Haitham /2013

Supervised by

Dr. Nidhal Niama Hussain

1437 A.H.

2015