جامعة بغداد

كلية التربية للعلوم الصرفة / أبن الهيثم

قسم علوم الحياة

الكشف عن السمية الوراثية لمستخلصات نبات الحرمل *Peganum harmala* L . باستعمال بعض المؤشرات الخلوية والجزيئية

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - أبن الهيثم - جامعة بغداد

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير

في علوم الحياة /علم النبات /البايولوجي الجزيئي

من قبل

سيف محمد أبراهيم

بكالوريوس علوم - قسم علوم الحياة

كلية التربية للعلوم الصرفة - أبن الهيثم- جامعة بغداد

بأشراف

أ.م.د.نضال نعمه حسين

1437هـ

2016 م

بِسـمِ اللّه الرَّحمـنْ الرَّحِيـم

((نَرْفَعُ دَرَجَاتٍ مِّن نَّشَاء وَفَوْقَ كُلِّ ذِي عِلْمٍ عَلِيمٌ))

صدقَ اللّٰه العظيم
(سورةيوسف:من الآية 76)

أقرار المشرفين على الرسالة

اشهد أن هذه الرسالة قد جرى تحت أشرافي في قسم علوم الحياة/ كلية التربية للعلوم الصرفة ابن الهيثم /جامعة وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم الحياة علوم في علوم الحياة /علم النبات/ الوراثة الجزيئية.

المشرف: د.نضال نعمة حسين

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

توصية رئيس قسم علوم الحياة

أشارة إلى التوصية أعلاه المقدمة من قبل الأستاذ المشرف الدكتورة نضال نعمة حسين، أرشح هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

رئيس القسم: د. مازن نواف عبود

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

إقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة الموقعون ادناه نشهد اننا قد اطلعنا على الرسالة الموسومة (الكشف عن السمية الوراثية لمستخلصات نبات الحرمل *Peganum harmala* L. باستعمال بعض المؤشرات الخلوية والجزيئية) المقدمة من قبل الطالب (**سيف محمد ابراهيم**) في قسم علوم الحياة وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وفيما له علاقة بها ونقدر أنها جديرة بقبول نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم النبات / وراثة جزيئية وبتقدير امتياز .

التوقيع :

الاسم : د. حسام سعدالله الدين

اللقب العلمي : استاذ مساعد

التاريخ :

(رئيس اللجنة)

التوقيع :

الاسم : د. جنان قاسم حسين

اللقب العلمي : استاذ مساعد

التاريخ :

(عضو)

التوقيع :

الاسم : د. محمد مهدي جواد

اللقب العلمي : مدرس

التاريخ :

(عضو)

التوقيع :

الاسم : د. نضال نعمة حسين

اللقب العلمي : استاذ مساعد

التاريخ :

(عضو و مشرفة)

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة / ابن الهيثم

التوقيع :

الاسم : د. خالد فهد علي

اللقب العلمي : استاذ مساعد

التاريخ :

الإهداء

إلى من يسعد قلبي بلقياها

إلى من تحت قدميها تكمن الجنة.... **(أمي)**

إلى من حفزني للعلم

إلى من علمني العطاء بدون انتظار.... **(أبي)**

إلى سندي في هذه الحياة....

إلى من أرى التفاؤل بعينيهم..... **(أخوتي)**

إلى من عرفت كيف أجدهم وعلموني ألا أضيعهم..... **(أصدقائي)**

إلى كل من مكانته في قلبي لا تمحى أهدي بحثي هذا.....

الباحث سيف

شكر وتقدير

الحمد لله رب العالمين ، والصلاة والسلام عـــــلى سيدنا محمد وال بيته الطيبين الطاهرين وصحبه وسلم تسليما كثيرا .

أتقدم بوافر التقدير والامتنان إلى أستاذتي الفاضلة الدكتورة **نضال نعمة حسين** لدعمها المتواصل لـــي وتوجيهاتها وحرصها الشديد على أنجاز هذه الرسالة بالمظهر اللائق فجزاها الله عـــني خير الجزاء. كما أشكر كل من عميد كلية التربية للعلوم الصرفة –ابن الهيثم متمثلا بالأستاذ الدكتور **خالد فهد الجبوري** و الأستاذ الدكتور **مازن نواف عبود** رئيس قسم علوم الحياة .

والشكر موصول إلى الأستاذ الدكتور **احسان عرفان حسين** و الدكتور **محمد مهدي جواد** و الأستاذ الدكتورة **بتول زينل علي** للعون والمشورة **و** لدعمهم لي خلال مدة دراستي بالمعلومات والكلمة الطيبة كما اشكر المدرس **ناهده غازي علوان** لتقويم الرسالة لغويا و إلى السيد **ثائر محمد أبراهيم** لدعمه إلي خلال دراستي بالمعلومات والكلمة الطيبة

وفي الختام يسرني أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى كل من مد لي يد العون فـــي مسيرتي العلمية و فاتني ذكره سهوا ، وفق الله الجميع لما فيه خير الدنيا و الآخرة ، انه سميع مجيب.

سيف محمد ابراهيم

الخلاصة

تم تقييم السمية الوراثية للمستخلصين المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل *Peganum harmala* L. في جذور نبات البصل كنظام أحيائي .عرضت جذور نبات البصل للتراكيز 200,100,50,25,10 % وزن/حجم من المستخلص المائي أو الكحولي لبذور الحرمل ولمدد تعريض مختلفة 72,48,24 ساعة لأجل دراسة تأثير هذه المستخلصين في متوسط طول جذور نبات البصل وفي بعض مقاييس الصفات الخلوية (دليل الانقسام ، دليل الأطوار ، نسبة و أنواع التشوهات الكروموسوميه) ، فضلا عن دراسة تأثير هذه المستخلصين في DNA جذور نبات البصل باستعمال تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للسلسلة DNA (Random amplified polymorphic DNA).

بينت النتائج بان مستخلصي بذور الحرمل المائية والكحولية أدت الى تثبيط معنوي في متوسط طول جذور البصل وقد زاد تثبيط نمو الجذور كلما زاد تركيز المستخلص. وجد ان التركيز نصف المؤثر Half effective concentration 50% في نمو جذور نبات البصل كان 50% عند استعمال المستخلص المائي و25% عند استعمال المستخلص الكحولي ، لذا فان المستخلص الكحولي أكثر تاثيرا في نمو جذور نبات البصل من المستخلص المائي.

أوضحت النتائج كذلك بان مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية أدت الى تثبيط معنوي في دليل الانقسام الخلوي (Mitotic index) لخلايا القمة النامية في جذور نبات البصل مقارنة بمعاملة السيطرة وقد زاد تثبيط دليل الانقسام كلما زادت تراكيز المستخلصات ولم يتاثر دليل الانقسام بزيادة مدة التعريض ، ونظرا لكون التراكيز 100% و25% للمستخلص المائي و الكحولي على التوالي خفضت دليل الانقسام MI تقريبا 50% مقارنة بمعاملة السيطرة لذا عدت تراكيز شبه مميتة ، اما التركيز 200% عند كلا المستخلصين المائي والكحولي فقد خفضت دليل الانقسام MI تقريبا الى 22% من معاملة السيطرة فعدت تراكيز مميتة.

أظهرت النتائج كذلك بان مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية أدت الى انخفاض معنوي في دليل الطور التمهيدي وارتفاع معنوي في دليل الطور الاستوائي ، فضلا عن ظهور نسبة عالية من التشوهات الكروموسومية في جذور نبات البصل المعرضة للمستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل وقد ازدادت نسبة التشوهات مع زيادة تراكيز المستخلصات ومدة التعريض وكانت أكثر التشوهات الكروموسومية تكرارا هي (الكروموسومات اللزجة Sticky chromosomes ،الجسور الكروموسومية Bridge chromosome ،التشتت الكروموسومي Disturbed chromosome، الاستوائي الكولشسينى C-metaphase) وقد ظهرت تشوهات كروموسومية اقل تكرارا (الكروموسومات المتأخرة Lagging chromosome،الانفصالي النجمي Star anaphase،انتقال الأقطاب Shifting of poles، التعدد الكروموسومي Polyploidy) .

درس تأثير مستخلصات بذور الحرمل في دنا DNA جذور نبات البصل باستعمال تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلةDNA (RAPD).استخدم 10 بادئات عشوائية سبعة منها فقط اعطت حزما متعددة لجميع العينات المدروسة ،وبأوزان جزيئية تراوحت بين (90 -1400) زوج قاعدة، بينت نتائج التضاعف العشوائي بان مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية ولجميع التراكيز المستعملة سببت أضرارا في دنا DNA جذور نبات البصل وأحدثت طفرات عديدة ظهرت على شكل فقدان لحزمة او اكثر او اضافة لحزم جديدة، لوحظ كذلك بان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي (43) حزمة اما في العينات المعاملة بالمستخلص المائي فكانت (35) حزمة لـذا فان المستخلص الكحولي كان اكثر تاثيرا في دنا جذور نبات البصل من المستخلص المائي واظهرت النتائج ان عدد مجموع الحزم المكتسبة كان اكثر من مجموع الحزم المفقودة في جذور نبات البصل ولكلا المستخلصين ومع اغلب البؤادئ المستعملة اذ كان مجموع عدد الحزم الجديدة في العينات المعرضة للمستخلص المائي (27) حزمة وللمستخلص الكحولي (32) حزمة بينما كان مـجموع عدد الحزم المفقودة في العينات المعاملة بالمستخلص المائي (8) حزم وللمستخلص الكحولي (11) حزمة.

انخفضت قيمة الاستقرار الجيني %Genomic template stability (GTS) ابتداءً من التركيز 10% لكلا المستخلصين وقد استمرت قيمة GTS بالانخفاض كلما زاد تركيز المستخلص موضحا وجود أضرار اكبر للدنا مع زيادة تراكيز المستخلصات.انخفضت قيمة GTS في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي بنسبة اكبر من انخفاضها في العينات المعاملة بالمستخلص المائي الذي كان أقل انخفاض 78.56% عـــند التركيز 200,25% في العينات المعاملة بالمستخلص المائي بينما كان أقل انخفاض 69.03 % عند التركيز 50% في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي تؤكد هذه النتيجة ان المستخلص الكحولي أكثر سمية وراثية من المستخلص المائي في جذور نبات البصل .

بينت شجرة القرابة الوراثية للعينات المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل فضلا عن معاملة السيطرة باستعمال معامل Jaccard للتباين الوراثي واعتمادا على نتائج التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة DNA .انعزلت عينات البصل المعرضة للمستخلص المائي عن تلك المعرضة للمستخلص الكحولي ، فضلا عن انعزال معاملة السيطرة في مجموعة منفردة مما يؤكد الأضرار العالية التي تحدثها مستخلصات بذور الحرمل في DNA جذور نبات البصل.

ت	الموضوع	الصفحة
	الفصل الأول	
1-1	المقدمة	1
	الفصل الثاني	
2	**استعراض المراجع**	
1-2	نبات الحرمل *Peganum harmala* L.	4
2-2	تصنيف نبات الحرمل *Peganum harmala* L.	4
3-2	الأسماء الشائعة لنبات الحرمل	6
4-2	المواد الفعالة في نبات الحرمل	6
5-2	الاستعمالات الطبية لنبات الحرمل *P.harmala*	9
6-2	السمية الوراثية Genotoxcity	10
1-6-2	السمية الوراثية والخلوية لنبات الحرمل *P.harmala*	13
2-6-2	استعمال نبات البصل كنظام بايولوجي للكشف عن السمية الوراثية	18
3-6-2	استعمال المؤشرات الجزيئية في دراسة السمية الوراثية	19
1-3-6-2	طريقة التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة DNA Random amplified polymorphic DNA(RAPD)	21
	الفصل الثالث	
3	**المواد وطرائق العمل**	
1-3	الأجهزة والمواد الكيميائية المستعملة	24
1-1-3	الأجهزة	24
2-1-3	المواد الكيميائية	25
2-3	مصدر بذور نبات الحرمل *P. harmala*	26
1-2-3	مصدر نبات البصل *Allium cepa*	26
2-2-3	تحضير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل	26
3-2-3	اختبار التركيز نصف المؤثر EC50 للمستخلص المائي أو الكحولي لبذور الحرمل	27
3-3	الدراسة الخلوية	27
1-3-3	المحاليل الكيمائية المستعملة في الدراسة الخلوية	27
2-3-3	معاملة جذور نبات البصل بالمستخلص المائي أو الكحولي لبذور نبات الحرمل	28

	للدراسة الخلوية	
3-3-3	التثبيت والحفظ	28
4-3-3	الفحص الخلوي	28
5-3-3	التحليل الاحصائي لنتائج الدراسة الخلوية	29
4-3	الدراسة الجزيئية	29
1-4-3	معاملة جذور نبات البصل بالمستخلص المائي أو الكحولي لبذور نبات الحرمل للدراسة الجزيئية	29
2-4-3	استخلاص الحامض النووي DNA Extraction	30
1-2-4-3	المحاليل المستعملة في استخلاص الحامض النووي DNA	30
2-2-4-3	طريقة استخلاص DNA	31
3-2-4-3	قياس تركيز DNA وتقدير نقاوته	32
3-4-3	الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز	32
1-3-4-3	المحاليل المستعملة في ترحيل DNA على هلام الاكاروز	31
2-3-4-3	خطوات ترحيل عينات DNA في جهاز الهجرة الكهربائية	33
4-4-3	تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة Random DNA amplified polymorphic DNA(RAPD)	34
1-4-4-3	المحاليل المستعملة تقانة في التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA	34
2-4-4-3	تقانة التضاعف العشوائي متعدد الإشكال لسلسلة DNA (RAPD)	35
3-4-4-3	التحليل الاحصائي لنتائج الدراسة الجزيئية	36
	الفصل الرابع	
4	**النتائج والمناقشة**	
1-4	النتائج	37
1-1-4	تأثير مستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل	37
2-1-4	الدراسة الخلوية	39
1-2-1-4	تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في دليل الانقسام MI	39
2-2-1-4	تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في دليل الأطوار الانقسام المايتوزي	40
3-2-1-4	التشوهات الكروموسومية	48

3-1-4	الدراسة الجزيئية	55
1-3-1-4	تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA (RAPD)	55
2-3-1-4	نسبة الاستقرار الجينوم Genomic template stability (GTS%)	64
3-3-1-4	مخطط التحليل العنقودي لعينات البصل المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية	66
2-4	المناقشة	68
1-2-4	تأثير مستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل	68
2-2-4	تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في نشاط الانقسام المايتوزي	69
3-2-4	تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA(RAPD)	74
	الاستنتاجات والتوصيات	
	الاستنتاجات	77
	التوصيات	78
	المصادر العربية	79
	المصادر الأجنبية	82

قائمة الجداول

ت	العنوان	الصفحة
1	المواد الفعالة (القلويدات) ونسبها في بذور نبات الحرمل	6
2	الأجهزة المستعملة في الدراسة	24
3	المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة	25
4	البادئات العشوائية التي تم استعمالها لتفاعلات RAPD مع تتابعاتها	34
5	دليل أطوار الانقسام المايتوزي ودليل الانقسام (MI) لجذور نبات الـــبصل المعرضة للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل	43
6	دليل أطوار الانقسام المايتوزي ودليل الانقسام (MI) لجذور نبات الـــبصل المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل	44
7	النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية وأنواع التشوهات لجذور نبات البصل *A.cepa* المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل *P.harmala*	49
8	النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية وأنواع التشوهات لجذور نبات البصل *A.cepa* المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala*	50
9	الحزم المكتسبة و المفقودة الناتجة من تقنية التضاعف العشوائي (RAPD) لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل	58
10	الحزم المكتسبة والمفقودة الناتجة من تقنية التضاعف العشوائي (RAPD) لعينات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل	59
11	نسبة الاستقرار الجينوم % GTS لعينات جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل	64
12	نسبة الاستقرار الجينوم % GTS لعينات جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل	65

قائمة الأشكال

ت	العنوان	الصفحة
1	نبات الحرمل وبذوره في البيئة الطبيعية .*Peganum harmala* L	5
2	التركيب الكيميائي للقلويدات β-Carboline	8
3	التركيب الكيميائي للقلويدات Quinazoline	8
4	خطوات عمل جهاز PCR	20
5	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل *A.cepa*	38
6	تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل *A.cepa*	38
7	دليل انقسام MI في جذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل	45
8	دليل انقسام MI في جذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل	45
9	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 24 ساعة	46
10	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 48 ساعة	46
11	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 72 ساعة	46
12	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 24 ساعة	47
13	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 48 ساعة	47
14	دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 72 ساعة	47
15	النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لبذور الحرمل	51

16	النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل	51
17	أنواع التشوهات الكروموسومية التي ظهرت في خلايا جذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل	54
18	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-2 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	60
19	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-3 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	60
20	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-4 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	61
21	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-7 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	61
22	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-8 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	62
23	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-9 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	62
24	نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-10 على هلام الاكاروز 1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي	63
25	الشجرة الوراثية لعينات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل .	67

قائمة المختصرات

bp	Base pair
CTAB	Cetyl trimethyl ammonium bromide
dATP	Deoxy Adenine triphosphate
dTTP	Deoxy Thymine triphosphate
dGTP	Deoxy Guanine triphosphate
dCTP	Deoxy Cytosine triphosphate
dNTPs	Deoxy nucleotide triphosphates
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
SSR	Simple sequence repeat
ISSR	Inter simple sequence repeat
GTS	Genomic template stability
UNEP	United Nation Environment Programme
WHO	World Health Organization
USEPA	United States Environmental Protection Agency
CIPM	Centre for Invasive Plant Management
ANOVA	Analysis of variation
pro	Prophase
met	Metaphase
ana	Anaphase
telo	Telophase

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

1-المقدمة INTRODUCTION

يعتمد عدد كبير من سكان العالم وتصل نسبتهم 75-80% على الأعشاب الطبية لمعالجة مختلف الأمراض و سيما في البلدان النامية ، اذ تعد عملية المعالـجة بهذه الأعـشاب الطبية كرعاية صحية أولية بسبب تقبلها من قبل سكان البلدان النامية وكذلك توافقها مع جسم الانسان،فضلا عن أثارها الجانبية القليلة مقارنة مع الأدوية الكيـميائية الحديثة وفي العقد الأخير لوحظت زيادة كبيرة لاستعمال النباتات الطبية في مجال صناعة الأدوية (Parekh *et al* .,2005)، وقد أفادت تقارير منظمة الصحة العالمية(WHO) ان ما يقارب 60 % من سكان العالم يعتمدون على النباتات الطبية كجانب من الرعاية الصحية الأولية بدون وعي صحي (WHO,2013)ومع ذلك فقد أفادت الدراسات المتعلقة بـهذا الموضوع ولعديد من الباحثين بان هناك مركبات كيميائية داخل هذه النباتات يكون لها تأثير سام والتي قد تسبب السرطان عند استعمالها (Ernst, 2004; Rietjens *et al*., 2005). لذلك أصبح من المهم جدا معرفة التأثير التطفيري والسام لهذه النباتات الطبية لان العديد منها تكون مواد سامة وهي بهذه الوسيلة تدافع عن نفسها ضد الرواشح (Viruses) والفطريات (Fungi) والبكتريا (Bacteria) وغيرها من المسببات المرضية الأخرى وهذه المركبات قد تكون لها أثار ضارة على من يستعملها للعلاج وقد تودي الى ظهور أعراض مختلفة بسبب استعمال بشكل عشوائي دون معرفة أو تحديد أضرارها (Liman *et al*.,2010).

تعد النباتات ومنها الأعشاب الطبية مصدرا مهماً في صناعة العقاقير الطبية لوجود بعض المواد الكيميائية ذات الفعالية البايولوجية لذا اعتمدت في تحضير الكثير من الأدوية والعقاقير الطبية تستعمل في الكثير من البلدان أنواع عديدة من النباتية الطبية ومنها نبات الحرمل بالرغم من التأثيرات الجانبية المحتملة في الصحة العامة إذ استعملت هذه النباتات دون معرفة او دراسة مسبقة لذلك اهتم الباحثون في مجال الخلية والوراثة بالتقييم المستمر لتلك النباتات وقياس السمية الخلوية الوراثية لها Cytogenotoxicity . ان زيادة المعلومات عن هذه النباتات الطبية وتأثيراتها في المستوى الخلوي للكائن الحي يكون ذا أهمية كبيرة لتقليل الأضرار المحتملة في حالة استعمالها بشكل مفرط ولكي تكون المعالجة بالنباتات الطبية بديلا ناجحا للـعلاجات الكيميائية الرائجة او الطب الحديث فيجب أجراء دراسات على خصائص هذه النباتات وعلى عدة مستويات منها وراثيا أو خلويا متضمنة قدرة مستخلصاتها وتأثيراتها في كائنات حية عديدة (Tedesco,2007).

يعد نبات الحرمل . *Peganum harmala* L احد النباتات الطبية المستعملة بشـكل واسع ويعود الى العائلة الغرقدية Nitraiaceae وينتشر بصورة رئيسة في أفريقيا وجنوب أمريكا والمكسيك والشرق الأوسط وجنوب غرب أمريكا (Kartal *et al*.,2003) و يستعمل نبات الحرمل في علاج العديد من

الأمراض مثل مرض السكري وضغط الدم والالتهابات المختلفة وفي الصين وإيران يستعمل لعلاج السعال والروماتيزم وارتفاع الضغط والربو وغيرها من الأمراض (Duan *et al*.,1998)، ويرجع استعماله بسبب احتوائه على القلويدات Alkaloids وهي من أهم المركبات الموجودة في نبات الحرمل وتوجد في البذور بنسبة (6 -2%) وكذلك وجدت في الجذور (Budavari & Neil .,1996) وتتركز القلويدات في البذور الناضجة (Kamel *et al*.,1970) تشمل القلويدات β-Carbolines (Harmine , Harmaline, Tetrahydroharmine,Harmalol , Harmane) و القلويدات Quinazoline ومشتقاتها هي (Vasicine , Vasicinone) (Massaod *et al*.,2002) .

ومن الانظمه البايولوجية المستعملة التي أثبتت قدرتها على تقييم التأثير التطفيري للمستخلصات النباتية هي البكتريا (*E.coli*) و الخمائر(الفطريات) و نباتي الباقلاء و البصل (النباتات) والفئران و الارانب وخلايا دم الانسان المزروعة مختبريا (الثدييات) وحشرة الدروسوفلا لما تتميز به تلك الكائنات من قصر دورة حياتها ، قلة عدد كروموسوماتها وصغر حجمها (Atef *et al*.,2011 ;Lopez *et al*.,2004 ;Abd El-Hamied,2001;Grant *et al*.,1992) ويعد نبات البصل نظاما بايولوجيا نموذجيا للكشف عن السمية الوراثية كونه احد الاختبارات الشائعة الاستعمال في مجال تقييم تاثير المستخلصات النباتية المختلفة والمركبات الكيمائية اذ اكد العديد من الباحثين كفاءة هذا الاختبار (FisKesjo,1985; Carita& Marin-Morales,2008; Leme& Marin-Morales,2009) كما اكدت العديد من المنظمات العالمية باستعمال النباتات كأحياء اختبارية ومنها منظمة الصحة العالمية WHO ويرجع ذلك لكفاءة هذا الاختبار لغرض المقارنة وتقييم التأثيرات المختلفة للمستخلصات النباتية والمركبات الكيمائية (Ma *et al*., 1995).

أجريت العديد من الاختبارات لدراسة السمية الوراثية كاختبار ايمز Ames test، اختبار طافرات العوز الغذائي Auxotrophic mutant test، اختبار قياس الشذوذ الكروموسومي Chromosomal aberration في الانقسام المايتوزى او المايوزى ، اختبار الانوية الدقيقة Micronuclei ،اختبار تبادل الكروماتيدات الشقيقة Sister chromatide exchange (Badawy & Ali ,2000) كما ويصاحب هذا النوع من الاختبارات دراسات على المستوى الجزيئي ومعرفة التغيرات التي تحدث في الدناDNA مباشرة أو في البروتينات ومن المؤشرات الجزيئية المستعملة لهذا الغرض بشكل واسع هي تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدنا (RAPD) وهى من المؤشرات الدقيقة التي بامكانها تحديد التأثير التطفيري لهذه المستخلصات وما تحدثه من تغير في كمية الأحماض النووية (DNA) و ايضا التغير في تتابع النيوكليوتيدات للحامض النووي بتقانة البلمرة المتسلسل (PCR) اذ استعملت في تقيم

السمية الوراثية للعديد المستخلصات النباتات الطبية كنبات الليمون والمعدنوس ،الكمون (Eren&Ozata ,2014 ;Baeshin,2009; Sunar *et al*.,2009;Mohamed,2004) واختبارها على العديد من الأنظمة النباتية كالبصل و الباقلاء والباذنجان والقمح (Guzin *et al*.,2010; Ganguly *et al*.,2010 ; Osama,2002; Chen *et al*.,2000) وهذا قد يؤدي الى فهم أوسع لامكانية استعمال هذه المستخلصات في مجالات مختلفة ومنها في المجال الطبي لأجل علاجات بعض الأورام السرطانية إذ أكد بعض الباحثين كفاءة بعض المستخلصات النباتية في هذا المجال ومنها الحرمل مختبريا (Mohammed *et al*.,2010) .لذلك بات من الضروري تقييم سميه مستخلصات بذور الحرمل على المستوى الخلوي والجزيئي لذلك اجري هذا البحث بهدف

1-دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل في نمو خلايا جذور نبات البصل فضلا عن أيجاد التركيز نصف المؤثر لهذه المستخلصات.

2- دراسة تأثير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل في النشاط المايتوزى لجذور نبات البصل من خلال دراسة دليل الانقسام MI ودليل الأطوار وتحديد التشوهات الكروموسومية في الخلايا المعرضة للمستخلصات.

3- الكشف عن التغايرات الوراثية في DNA جذور نبات البصل المعرضة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل باعتماد تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA (RAPD).

4- المقارنة بين المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل لتأثيرها السمي في جذور نبات البصل على المستوى الخلوي والجزيئي.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

LITERATURE REVIEW

2- استعراض المراجع LITERATURE REVIEW

2-1- نبات الحرمل *Peganum harmala* L.

يعد نبات الحرمل *Peganum harmala* من النباتات المعروفة عالميا وذلك لاستعمالاته المختلفة في الطب الشعبي (محمود ، 2008).ينتشر نبات الحرمل بريا في الأراضي الصحراوية إذ يمثل الشرق الأوسط وجنوب أوربا وشـمال أفريقيا المـوطن الرئيسي له (Kartal*et al*.,2003 ; الايوبي، 2003) فضلا عن انتشاره في وسـط العراق وشماله (Al-lzzy,2010). يصنف الحرمل من الاعشاب المعمرة ، إذ يكون طولـه (30-90) سم واغلب تفرعات الاغصان تظهر من قاعدة السـاق اما الأوراق فتكون مفصصة وذات رائحة مميزة وتكون بشكل متبادل على الساق ويكون نصل الورقة بيضويا ويتفرع لفصوص شريطـية(مجيد ومحمود،1988). اما أزهاره نجمية الشكل ذات لون ابيض وتوجد فـي الأجزاء القمية للنبات وتتكون من خمس أوراق كاسـية اما تكون منفصلة وفي بعض الاحيان تـــــكون ملتحمة وتحتوي على خمس أوراق تويجية ذات لون ابيض مصفر وتكون ذات شكل بيضوي مـقلوب، وتحتوي على 15 سـداة و الخويط يكون متطاولا ،والمبيض يتـكون من ثلاث أقسام ، إما ثماره مـــــــن النوع علبية Capsule شـبه كروية تحتوي على بـــذور مستديرة من جانب واحد تتمتع بلون بني غامق كما تمـتاز برائحة نفاذه قوية (Yingxin,1998; Al-rawi& Chakravarty,1988) شكل (1).

2-2-تصنيف نبات الحرمل *Peganum harmala* L.

ينتمي نبات الحرمل قديما الى عائلة خناق الدجاج Zygophylaceae ويصنف حاليا ضمن العـائلة الغرقدية Nitrariaceae (Goel *et al*.,2009; Encyclopedia of Life,2013)

Kingdom: Plantae

Phylum : Angiosperms

Class : Eudicots

Subclass : Rosids

Order : Sapindales

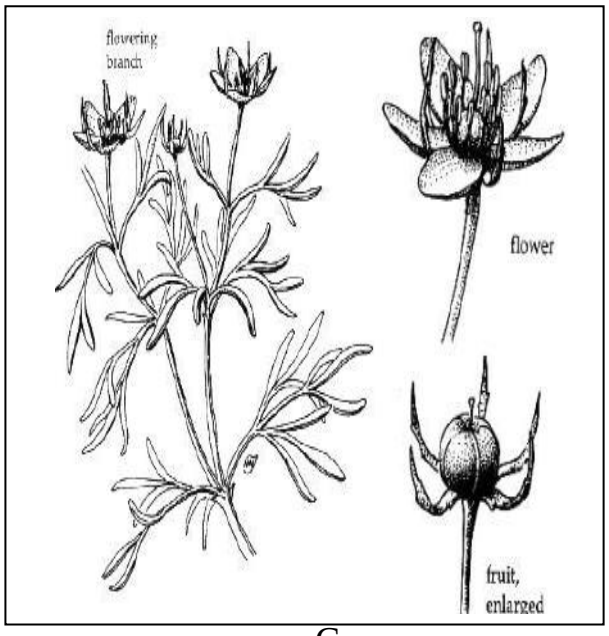
Family : Nitrariaceae

Genus : Peganum

Species*: harmala L.*

A

B



C

D

شكل (1) نبات الحرمل وبذوره في البيئة الطبيعية .*Peganum harmala* L

A- نبات الحرمل .*P.harmala* L

B- بذور نبات الحرمل .*P.harmala* L

C- رسم توضيحي لأجزاء نبات الحرمل (الزهرة والثمرة)

D- نبات الحرمل كاملا

.(Asgarpanah & Ramezanloo,2012)

2-3- الأسماء الشائعة لنبات الحرمل

نبات الحرمل له أسماء شائعة عديدة وحسب البلد الذي ينمو فيه اذ يطلق عليه الحرمل وحرملة والحرملان و السذب البري في كل من الاردن والعراق وسوريا والمغرب العربي على التوالي،إما في الجمهورية الإسلامية الإيرانية يطلق عليه سفندان(Kamel *et al*.,1970)، اما في اسبانيا يسمى Alharma وGamarza ،ويطلق عليه في السويد Harmelbaske، وفي فرنسا يسمى Rue sauvage ،وفي المانيا يطلق عليه Steppenrute (Mahmoudian *et al*., 2002)،وفي روسيا يسمى Garmala، وفي تركيا يطلق عليه Uzarih (Seidemann *et al*., 2005).

2-4- المواد الفعالة في نبات الحرمل

تعد القلويدات Alkaloids من أهم المركبات الموجودة في نبات الحرمل،وتوجد في البذور بنسبة (2- 6%) وكذلك وجدت في الجذور (Budavari& Neil .,1996) وتتركز القلويدات في البذور الناضجة (Kamel *et al*.,1970) جدول (1-1)، تشمل القلويدات β-Carbolines Alkaloids (Harmine ,Harmaline, Tetrahydroharmine,Harmalol,Harmane) شكل (2) و القلويدات Alkaloids Quinazoline مشتقاتها (Vasicine, Vasicinone) شكل (3) (Massoad *et al*.,2002).

جدول (1_1) المواد الفعالة (القلويدات) ونسبها في بذور نبات الحرمل .

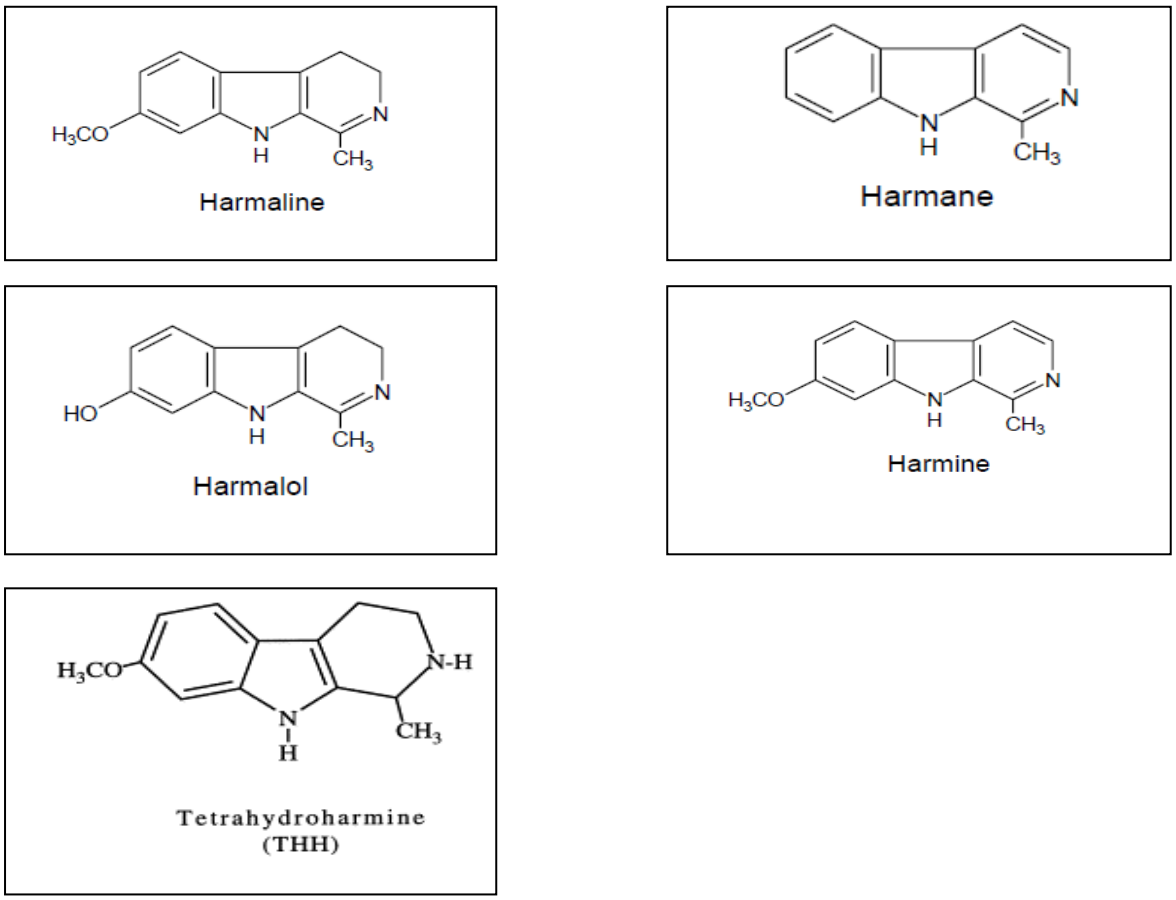
المواد الفعالة	نسبتها	المصدر
Harmane	0.16%	(Pulpati *et al*., 2008)
Harmine	0.44-4.3 %	(Herraiz *et al*.,2010)
Harmaline	0.25-5.6 %	(Pulpati *et al*., 2008)
Harmalol	0.6-3.90 %	(Lamchouri *et al*.,1999)
Tetra hydroharmine	0.1 %	(Herraiz *et al*.,2010)
Vasicine	0.25 %	(Pulpati *et al*., 2008)
Vasicinone	0.0007 %	(Pulpati *et al*., 2008)

يعد Harmaline الأكثر سمية من المكونات الأخرى وقد يسبب استعماله بجرع متوسطة التشنجات وفي الجرع العالية قد يسبب التشنجات المصحوبة بالشلل الحركي Motor paralysis فيسبب شللا في التنفس وانخفاض درجة حرارة الجسم (Glasby,1987). يعد Harmaline من القلويدات الفعالة في الحرمل إذ يعمل كمحفز للجهاز العصبي ويستعمل لعلاج الاكتئاب في اليمن (Massaro,2002).

اما Harmine فيعد من القلويدات الاقل سمية من Harmaline ويتميز بنشـــــاطه كمضاد للبكتريا المسببة لداء السل *Mycobacterium tuberculosis* ويستعمل في علاج مرض الشلل الرعاش Parkinson's disease (Sanchez-Ramos,1991)،ويستعمل قلويد Harmine كـــــمضاد لنشاط البكتريا (Gaviraj *et al*.,1998) ومثبط للأورام ومضـــــــــــــــــاد للأكسدة ومثبط للأنزيمات (Sobhani *et al*., 2002) فضلا عـــــــن خصائصه المناعية (Bian *et al*.,1987)، وأشار (Lala *et al*.,2004) الى التأثير الفعال لمركب القلويد Harmine في قتل وتدمير طفيليات داخل الخلايا Intracellular ويستـعمل بشكل كبسولات لعلاج هذه الطفيليات ، تعد بذور نبات الحرمل أكثر الأجزاء سمية و وجـد كـذلك بان أوراق نبات الحرمل كانت أكثر سمية من سيقانه وجذوره والسبب يعود الى وجود الأحماض الفينولية (Massoad *et al*.,2002).

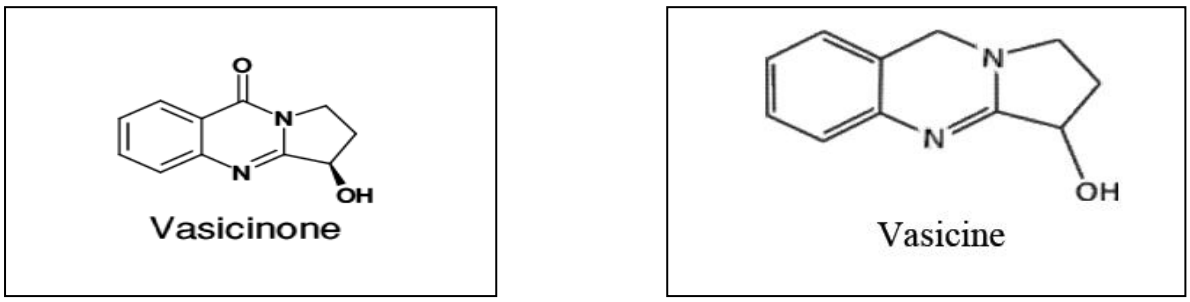
وقد بين (Misra *et al*.,2008) ان مركب Vasicine الموجود في الحرمل له فعالية تثبيطية لطفيلي الليشمانيا *Lieshamiaina donovani* .

شكل (2)التركيب الكيميائي للقلويداتβ-Carboline



.(Mahmoudian *et al*., 2002)

شكل (3) التركيب الكيميائي للقلويداتQuinazoline



.(Mahmoudian *et al*., 2002)

2-5- الاستعمالات الطبية لنبات الحرمل *P.harmala*

يعد نبات الحرمل من النباتات المستعملة بشكل واسع في الطب الشعبي ولاسيما في الدول النامية وتعود استعمالات نبات الحرمل الدوائية لوجود بعض المواد الكيميائية التي تم عزلها من بذور النبات وأهمها القلويدات من نوع β-carboline Alkaloids وتشمل (Harmine,Harmaline,Harmalol,Harmane,Tetrahydroharmine) وكذلك نوع قلويدات Quinazoline (Vasicine, Vasicinone) (Pulpati *et al*.,2008 ;Astulla *et al*.,2008). يستعمل الحرمل كمسكن للآلام ومضاد للالتهابات ومضاد لنشاط البكتريا Antibacterial activity (Lamchouri *et al*.,1999) ومضاد للمواد المسببة السرطان Anti carcinogenic (Farouk *et al*.,2008). استعملت بذور الحرمل في معالجة سرطان الجلد وتحت الجلد Subcutaneous cancer،وكذلك كمحفزة للجهاز الهضمي (Bown,1995)،وفي علاج بعض أمراض الجلد (El saad& El-Rifaie,1980) Dermatoses.وكذلك في معالجة أمراض الرحم وبعض أمراض المسالك البولية و الاختلالات الجنسية Sexual disorders ولمعالجة الصرع ومشاكل الدورة الشهرية وبعض الامراض العقلية (Phillips & Rix,1991) .تحتوي بذور الحرمل على مادة Harmine التي تستعمل في علاج الأمراض العقلية وفي علاج التهابات الدماغ (Bown,1995).استعملت بذور الحرمل في علاج الجروح Wound healing (Derakhshanfar&Mirzaei,2008)،إما بخار بذور الحرمل ومسحوقها فقد استعمل في علاج الحمى والاسهال وحالات الاجهاض، واستعملت كمادة مضادة للبكتريا والفطريات والرواشح (Rashan *et al*.,1989) ومحفزة للجهاز العصبي المركزي (Berrougui *et al*.,2006).

أوضحت الدراسات بان المكونات الفعالة لبذور الحرمل اظهرت نشاطا مثبطا لبعض الأنزيمات كأنزيم Acetylcholine esterase(Wang *et al*.,2008)، ومثبطا لنشاط أنزيم Monoamine oxidase (Herraiz *et al*.,2010)، ويستعمل الحرمل في معالجة ضغط الدم (Dewick,2009) ويستعمل دخان بذور الحرمل بعد الحرق شعبيا كمطهر (Shahverdi *et al*.,2008) فضلا عن استعماله للقضاء على الأوبئة وكعامل مهدئ (Lamchouri *et al*. ,1999). ذكر (بيضون ،2003) ان للحرمل فعالية طبية كمادة مضادة للتشنج العضلي وطارد للديدان الشريطية Vermifuge والديدان المعوية Anti-helminthic وله تأثير قاتل للطفيليات الابتدائية Protozoaicide ، كما يعمل على توسعة الأوعية الدموية.يستعمل مستخلص الحرمل كشراب لعلاج الملاريا المزمنة وذلك من خلال خلطه مع تمر الهند (Frison *et al*.,2008). كما له استعمالات لعلاج الأزمات التنفسية والربوAsthma واليرقان Jaundice (محسن ،2009) وكذلك يوصف لادرار الحليب وفاتح للشهية ومدرر للطمث، وإما الزيوت المستخرجة من بذوره توصف لعلاج التهابات العيون (محمود،2008).

ذكـــــــر(Abdel Fatah,1995) ان مستخلص نبات الحرمل لـه تأثير خافض للحرارة. وتستعمل بذور الحرمل لعلاج الأمراض النفسية (El Gendy& El-Kadi,2009). اسـتعملت جذور نبات الحرمل في معالجة الروماتيزم وبعض الحالات العصبية (Saad *et al*., 2008).

6-2- السمية الوراثية Genotoxcity

تعد السمية الوراثية مجموعة من التغيرات التي تحدث على الكائن الحي بسبب تعرضه لمادة سامة وهي تغيرات خلوية وراثية Cytogenetic قد تنعكس بـطبيعة الحال على أنشطة وظائف أعضاء الكائنات الحية المختلفة. وتمثل مراحل الانقسام الخلوي Cellular division أفضل مـــكان لاكتشاف الاختلالات الخلوية التي غالبـا ما يكون لـها تأثير وظيفي Functional أو شكلي Morphological في الكائن الحـي (أبو خطوة،1992). ومن الجدير بالذكر ان هناك عدة أنواع من التغيرات أو الطفرات التي تحدث على مستوى الكروموسوم اما على العدد الكروموسومي أو تركيبه أو تـــكون الطفرات على مستوى المادة الوراثية (RNA,DNA) وقسم (Stansfield,1969) الطفرات التي تحدث بسبب السمية الوراثية إلى

أولا:- الطفرات الجينية Gene mutation

وهي تشير إلى أي تغير يحدث على تركيب أو بناء جين معين Gene ضـــــمن جينوم الكائن الحي، وتأخذ الطفرة الجينية عدة صور ومنها إضافة قاعدة Addition أو حذف قاعدة Deletion أو تغير موقع قاعدة معينة الاستبدال Base substitution أو تغير في الازاحة Framing error .

ثانيا :- اختلالات كروموسومية Chromosome aberrations

وهي الطفرات التي تحدث بسبب أي تغير على عدد أو بنية أو ســــــــــلوك الكروموسومات (الغامدي واخرون ،1994) وتشمل هذه الطفرات أو الاختلالات صور متعددة تحدث خلال الانقسام الخلوي وهي

1- كروموسومات حلقية الشكل Ring shape chromosomes

تظهر بعض الكروموسومات على شكل حلقة Ringوتحدث هذه الحالة بسبب حـــــدوث كسرين في الكروموسوم تؤدي إلى وجود أجسام طرفية مفقودة Telomeric losses ومن ثم حدوث عمـــلية أعاده الالتحام Rejoining اللأطراف المكملة لبعضها (Raghuvanshi & singh,1976).

2- تغير عدد الكروموسومات Aneuploidy

تمثل هذه الحالة تغيرا في كروموسوم واحد ضمن المجموعة الكروموسومية من حيث العدد أي إما نقص أو زيادة لكروموسوم واحد، وفي اغلب الأحيان تحدث نتيجة لتعرض الخلية لعوامل مطفرة مختلفة تعمل على فشل احد الكروموسومات في التحرك الى احد قطبي الخلية الذي يؤدي الى فقدان الكروموسوم من المجموعة الكروموسومية للنبات (Lawley& Brookes,1963).

3- التشتت الكروموسومي Chromosomal disturbed

تحدث هذه الحالة خلال الـــــــــطور الاستوائي وتسمى Disturbed metaphase أو خلال الطور الانفصالي وتسمى Disturbed anaphase إذ تظهر الكروموسومات في وضع متشتت ومختلف لوضع الكروموسومات في الحالة الطبيعية ويعود السبب في ذلك لوجود خلل في جهاز المغزل الذي يعمل على تكوين خيوط المغزل (Lawley& Brookes,1963).

4- الجسور الكروموسوميه Chromosomal bridges

تظهر هذه الحالة في الطور الانفصالي أو الطور النهائي للانقسام الخلوي الذي قد يعود إلى حدوث تبادل غير متساو أو كسر طرفي في الكروموسوم قبل التضاعف الذي ينتج عنه كروماتيدين شقيقين بأطراف قابلة للالتصاق Sticky ends الذي تكون عند اندماجها كروماتيدات ذات جسيمات مركزية ثنائية (Haliem,1993).

5- تعدد الأقطاب Poly polars

تحدث هذه الحالة نتيجة المعاملة ببعض المواد المطفرة التي تؤدي الى كبح جزئي لكفاءة خيوط المغزل وتظهر فيها الكروموسومات منجذبة باتجاه أكثر مـــــن قطب وتكون على حالتي ثلاثي الأقطاب وتدعى Tripolars أو رباعية الأقطاب فتدعى Tetra polars (Haliem,1993).

6- تكسر كروموسومي Chromosomal fragmentation

تظهر هذه الحالة نتيجة تكسر الكروموسومات وتحولها إلى قطعة صغيرة جدا ذات جـسم مركزي أو وجود الكروموسومات المتأخرة Lagging chromosomes إذ تـحاط كل قطعة من هذه القطع بغشاء نووي مكونة نواة دقيقة تدعى Micronuclei و يوجد اختبار يدعى Micronuclei test اختبار الانوية الدقيقة وتستعمل للكشف عن هذه الحالة (Duan *et al.*,1998).

7- الكروموسومات المتلاصقة Chromosomes stickiness

تظهر فيها الكروموسومات غير واضحة المعالم و متداخلة بعضها مع بعـضها الأخر مما يعطي هذه الكروموسومات شكل كتلة واحدة (Badr *et al.*,1985).

8- الخلايا ثنائية النوى Binucleated cells

تظهر هذه الحالة عند حدوث فشل في بناء الصفيحة الوسطى Middle Lamella بين الخليتين البنويتين مما يؤدي الى ظهور خلية ثنائية النواة (Duan *et al.*,1998).

9- التشابك الكروموسومي Chromosome clumping

تظهر هذه الحالة نتيجة انقباض الكروموسومات بعضها مع البـــــــــــــــــــعض الأخر (Lawley& Brookes,1963).

10- الكروموسوم ذو الشكل النجمي Chromosome Star shape

تظهر في هذه الحالة المجموعة الكرموسومية متجمعة حول المغزل بشكل نجمي (Amer,1965).

11- الكروموسوم المتأخر Chromosome lagging

تحدث هذه الحالة في وجود كروموسومات في غير مكانها الطبيعي بعيدة عن خيوط المغزل في الطور الاستوائي أو قربيه من خط الاستواء المغزل في نهاية الطور الانفصـالي وفـــي الحالتين يكـون متأخر عن المجموعة الكروموسوميه(Vig,1971; Dewey & Miller ,1969).

12- توقف الانقسام الخيطي Mitotic arrest

في بعض الحالات تتوقف الخلية في إحدى أطوار الانقسام إما الطور الاستوائي ويـــــــــدعـــى C–Metaphase أو الطور الانفصال ويدعى C-Anaphase إذ تظهر الكروموسومات هذه الأطوار المتوقفة درجة كبيرة من الحلزنة للكروموسومات وغالبا ما تكون هذه الكروموسومات غير متوجهة إلى أقطاب الخلية وتتخذ شكل مشابة للحرف C ممكن ان تحدث هذه الحالة بـــسبب اضطرابات أو خلل في عمليات بناء وتكوين الأحماض النـووية والبروتينات مما يؤدي إلى حدوث نقص في هذه المواد أو يعود ذلك إلى فشل فـــــــــــــــي تكوين خيوط المغزل بـــــــــــشكل ملائم لحدوث الانقسام الطبيعي (Vig,1971; Dewey & Miller ,1969).

2-6-1- السمية الوراثية و الخلوية لنبات الحرمل *P.harmala*

درست السمية الوراثية للمستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل مـــــــن قبل العديد من الباحثين اذ ذكر (Sathiyamoorthy *et al*.,1999) بان المستخلص المائي لبذور نـبات الحرمل حقق نـسبة هلاك طفيلي الاميبا الحالة للنسيج 62.1 % *Entameoba histolytica* إما المســـتخلص الكحولي فكانت نسبة القتل 66.8% عند استعماله بتراكيز مختلفة في المختبر in vitro، إما(الشنوي ،2009) فقد درست تأثير مزيج للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل وأوراق نبات الشيح ضـــــد طفيلي الاميبا الحالة للنســـــــيج *Entameoba histolytica* إذ سجلت أعلى نـــسبه هلاك 98.5% عند التركيز 1500 مايكرو غرام/مل من مزيج المستخلص الكحولي لكلا النباتين وأصبحت نـسبة الهلاك 89 % لمزيج المستخلصين المائي لكلا النباتين وللتركيز نفسه وقد فسرت سبب هذه النسبة العالية للقتل ســـــواء للمزيج المائي أم الكحولي الى المحتوى العالي من المواد القلويدية والمواد الصابونية لبذور الحرمل والى الزيوت الطيارة والمركبات الفينولية المتواجدة بتراكيز كبيرة لنبات الشيح. كما أوضـــح (sathiyamoorthy *et al*.,1999) بان المستخلص المائي لبذور الحرمل تثبط نمو طـفيلي *P. malariae* المسبب لمرض الملاريا.

وقد درسـت (Shonouda *et al*., 2008) تأثير المستخلص الكحولي لأوراق نبات الحرمل *P.harmala* في يرقات وبالغات دودة أوراق القطن *Spodoptera littoralis* ،وبيـــــــنت النتائج أن تركيز 5% من المستخلص يؤدي إلى هلاك البالغات واليرقات. درســت (الشنوى وباقر،2011) تأثير مزيج المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل ومخاريط السرو في فعالية الرؤيسات الأولية للمشـــوكة الحبيبية *Echinoccus granulosus* المحقونة في الفئران البيض،وقد بينت النتائج حدوث اختزال في المجموعة المعاملة بمزيج المستخلص وعدم وجود اكياس المشوكة الحبيبة الثانوية ،فضلا عـــن حدوث انخفاض معنوي في متوسط أوزان الكبد Liver وتغيرات نسيجية في الخلايا الكبدية وزيادة أعداد خلايا كـوبفر Kupffer cells وزيادة وزن الطحال واظهر توسعا في اللب الأبيض مما عمل على زيادة تحفيز الجهاز المناعي وتثبيط رؤيسات دون اثار جانبية سلبية.اظهر المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل أعلى نسبة تثبـيط لأكياس طفيلي *Cryptosporidium spp* في الفئران المختبرية بالمقارنة مع مستخلـــص نبات الشيح ، نبات الخروع ، نـــبات الزعتر ، نبات الزيتون وبلغت 65.9 %عند تركيز 500 ملغم/مل مـن وزن الجسم وهذا الطفيلي *Cryptosporidium spp*يـــصيب الاطـفال مـــن عمر (6 اشهر-5 سنوات) (Al -Dulaimi *et al*.,2013). درس (Khoshzaban *et al*.,2014) تاثير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في طفيلي الليشمانيا *Leishmania major* المحقونة في الفئران المختبرية ، وقد بينت النتائج ان المستخلص الكحولي لبذور الحرمل كان له أعلى فعالية تثبيط على طفيلي *Leishmania* .

بين (Arshad *et al*.,2008) تأثير مادة β-Caroline والمواد القلويدية الأخرى المستخلصة من بذور نبات الحرمل في نمو 19 سلالة من البكتريا المقاومة للمضادات الحيوية وبينت النتائج وجود تثبيط لنمو البكتريا عند معاملاتها بتركيز (38-155)ملغم /مل،ذكر (Arshad *et al*.,2008) تأثير مستخلص بذور الحرمل في ثلاثة أنواع من البدائيات Protozoa هي (*Histomonas meleagridis* *Tetratrichomonas gallinarum* , *Blastocystis* sp,) وبينت النتائج وجود تأثير مثبط لمستخلص بذور الحرمل فيها عند معاملتها بتركيز(63-165) ملغم/مل. بين (Mohammed,2010) أن المستخلص المائي لبذور الحرمل تؤدي الى تحفيز الجهاز المناعي عن طريق زيادة أعداد كريات الدم البيض عند إصابة الفئران الاختبارية المصابة ببكتريا البروسيلا المجهضة *Brucella abortus* بتركيز 500مايكروغرام/20غرام.اما الباحثان(جازع وعبد الحميد،2012) فدرس التأثير المثبط للمستخلص المائي والكحولي لأوراق نبات الحرمل ونبات عين البزون في بكتريا *Staphylococcus aureus*، كانت أعلى نسبة تثبيط عند المستخلص الكحولي بتركيز 250,500 ملغم/مل لكلا النباتين، ودرس الباحثان (جازع وعبد الحميد،2012) تأثير المستخلص المائي والكحولي لنباتي الحرمل وعين البزون في كريات الدم الحمراء في الانسان(مختبريا) واتضح من النتائج ان تركيز 500 ملغم/مل من المستخلص المائي والكحولي لعين البزون لم تؤثر في كريات الدم الحمراء إما التركيز نفسه للمستخلص المائي والكحولي للحرمل فقد أدى الى تحلل كريات الدم الحمراء. درس (الخزرجي واخرون ،2013)التاثير المثبط للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل *P.harmala*في نمو بعض انواع البكتريا المرضية قد بينت النتائج تثبيط نمو بعض اجناس البكتريا السالبة لصبغة كرام ومنها *E.coil* ,*Salmonaella* *Pseudomonas aeruginasa*, واجناس البكتريا الموجبة لصبغة كرام ومنها *Bacillus spp* *Staphylococcus aureus*,عند استعمال تراكيز (25-500 ملغم/مل) من المستخلص المائي لبذور الحرمل ، وسجلت زيادة في تثبيط بكتريا الموجبة لصبغة كرام مقارنه بالسالبة لصبغة كرام.

درس (Basehin *et al*.,2008) تأثير المستخلص المائي لأوراق نبات الحرمل في الفطر *Aspergillus terreus* عند معاملته بتراكيز مختلفة بينت النتائج وجود تأثير قاتل ومطفر للفطر *A.terreus* . بين (Al-ASadi,2008) تاثير المستخلص المائي والكحولي لنبات الحرمل *P.harmala* *في تثبيط* نمو الفطر *Mauginiella scaettae* . اما (جرجيس و الحيالي،2010) فقد أوضحوا إن استعمال تراكيز (2500,2000,1500,1000)مايكروغرام/مل من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل قد أدى إلى احداث طفرات على الحوافظ المشيجية لفطر *Aspergerillus amstelodami*. كما بينت (حسن،2010)تأثير المركبات القلويدية لبذور نبات الحرمل .*P.harmala* L على نمو أربعة أنواع من الفطريات الممرضة للنـــباتات وهي *Fusarium oxysporium* , *Aspergillus niger*, *Macrophomenia phaseolina* , *Alternaria alternate* وأوضحت النتائج بان المركبات

القلويدية لبذور نبات الحرمل تؤدي إلى تثبيط نمو الفطريات بنسبة (44% ،73.3 % ،57.3 % ،57.3 %) على التوالي عند معاملتها بتركيز 5 ملغم /مل. وجد (Al-Izzy,2010) التأثير المثبط لمستخلص نبات الحرمل في نمو فطر *Candida , Lactobacilli* التي تم عزلها من لعاب الانسان. درس (حمد وحمد، 2012) التأثير المثبط للمستخلصات المائية والكحولية لنبـاتي الحرمل والرشاد في الفطر *Fusarium verticillioides* إذ بينت هذه الدراسة أن أعلى نسبة تثبيط سجلت للمستخلص الكحولي والمائي لبذور الرشاد وبلغت 57.50 % و 52.28 % على التوالي ،أما نسبة التثبيط لنمو الفطر نفسه بالمستخلص الكحـولي والمائي لبذور الحرمل فقد بلغت 33.83 % و 23.03 % ،على التوالي و كان أعلى متوسط لتحطيم السم FB1(Fumonisin B1) مع المستخلص الكحولي لبذور الحرمل وبلغت 25.83 %.

درس (Abbassi *et al*., 2003 a)التأثير السمي للمستخلص الكحولي لنـــــــــــــبات الحرمل *P.harmala* في معيشة وتغذية وسلوك وتكاثر حشرة الجراد المهاجر *Schistocerca gregaria* .كما ذكر (حمزة ، 2005) أن تأثير المستخلص المائي لبذور الحرمل فـي الأطوار اليرقية لحشرة الذبابة المنزلية *Musca domstica* يعتمد على درجة حرارة الماء المستعمل في الاستخلاص ، إذ بينت النتائج زيادة الفعالية القاتلة للاطوار اليرقية المدروسة باستعمال تركيز 50 ملغم/ مل مـن المستخلص المائي المغلي اذ كانت نسبة القتل 94%، إما عند استعمال المستخلص المائي البارد فكانت نسبة الهلاك 26% . وجـد (Jbilou *et al*., 2006) تأثيرا قاتلا للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في يرقات وبالغات حشرة خنفساء الطحين *Tribolium castaneum* التي تصيب الحبوب باستعمال تراكيز مختلفة . ذكـر (Al-Dosari *et al*.,2008) تأثير زيت بذور نبات الحرمل *P.harmala* في الحشرة القشرية البيضاء التي تصيب نبات النخيل ، وبينت النتائج ان أعلى نسبة قتل للحشرة عند تـــركيز 2%. درسـت (الحسيني ، 2009) مستخلصات الكلوروفورم والهكسان لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في خنفساء الحبـــوب الشعرية (الخابرا) *Trogoderma granarium* من اجل وقاية حبوب القمح منها، وقد بينت النتائج أعلى نسبه قتل لمستخلص الكلوروفورم على الأدوار غـــــير البـالغة Immature و الحشرات الكاملة Adult وبلغت 100 % عند المعاملة بتركيز (10 ملغم /مل)، إما مستخلص الهكسان كانـت نسبة الهلاك 100% على الأدوار غير البالغة والحشرات الكاملة عند معـاملتها بتركيز (25 ملغم/مل) . ذكـر (Abbasipour *et al*., 2010) تأثير المستخلص الكحولي لبذور نـــبات الحرمل في حشرة *Plutella xylostella* ،اذ اظهر المستخلص الكحولي تأثيرا واضحا فـــي زيادة هلاك العث ذي الظهر الماسي وتقليل أوزان اليرقات والعذارى وكانت نسبة القتل 66% عـــــــــــند معاملتها بتركيز 30 ملغم/مل، وأصبحت نسبة الهلاك 100% عند تركيز 40 ملغم /مل . درس (شهاب واخرون،2010) التاثير الطارد للمستخلص المائي والكحولي والزيتي لبذور نبات الحرمل في إناث

بعوض *Culex pipiens* ،وبينت النتائج أن أعلى تأثير كان للمستخلص الزيتي لبذور الحرمل عند تراكيز (20,15,10,5,2%)وكانت نسبة طرد بالغات البعوض (83,76,67,56,33%) على التوالي. ذكر(كاظم ،2013) التأثير القاتل للمستخلص المائي لنبات الحرمل في يرقات البعوض *Culex pusillus* وسجل نسبة قتل 13.33 % بعد مرور24 ساعة ثم ارتفعت نسبة هلاك اليرقات إلى 40 % بعد مرور 48 ساعة من المعاملة بالمستخلص.

درس (Hamden *et al*.,2008)تأثير المستخلص المائي لنبات الحرمل *P.harmala*على ذكور الجرذ المستحثة بمادة الثايو يوريا وجد أن المستخلص يعمل على تقليل السمية لمادة الثايو يوريا، ولاحظ ان مسحوق الحرمل يعمل على تثبيط أنتاج النطف وخصوبة ذكور الجرذ. درست (Abdulameer ,2013)تأثير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل في أنسجة الكبد والطحال في ذكور الفئران، وبينت النتائج أن تركيز 50 ملغم/مل من المستخلص المائي تؤدي الى ظهور خلايا من الكبد والطحال تحتوي على نواتين، كما اظهر الفحص النسيجي لمقاطع من كبد الفئران المحقونة بـ 100 ملغم/مل على حصول احتقان في الأوردة المركزية مع حدوث تغيرات في النواة فضلا عن تحلل السايتوبلازم وعدم وضوح الحدود الخارجية للأوعية الدموية مع تجمع كبير لخلايا البلعم البكتيري والخلايا اللمفاوية ،إما المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل فقد اظهر تجمعات للخلايا اللمفاوية وخلايا العدلة ، كما اظهر احتقانا كبيرا في منطقة اللب الأحمر للكبد فضلا عن تسرب السكريات البروتينية في المقاطع . درست (جواد و اخرون ا،2014) التأثيرات النسجية للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل *P.harmala* بتركيز 30 % في طبقات قشرة المخيخ لذكور الأرانب البيض إذ سجلت وجود انخفاض معنوي في متوسط سمك طبقتي بركنجي الوسطية وسمك الطبقة الحبيبية الداخلية وعدم وجود اختلاف معنوي في سمك الطبقة الجزيئية الخارجية في مخيخ ذكور الأرانب المدروسة. درست (جواد واخرون ب،2014) التأثير الوظيفي للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* بتركيز 20 % في بعض البروتينات والأنزيمات لذكور الأرانب البيض وقد سجلت وجود انخفاض معنوي في متوسط مستوى البروتين الكلي ومستوى الالبومين ومتوسط أنزيمي Glutamic Pyruvic Transaminase(GPT) وGlutamic OxaloaceticTarnsaminase (GOT)عند مقارنتها بالسيطرة وعدم وجود آية فروق معنوية في متوسط مستوى الكلوبيولين.

استعمل المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل لاختبار تاثيره في الخلايا السرطانية مختبريا ، إذ بينت النتائج زيادة واضحة في عملية الموت المبرمج للخلايا السرطانية Apoptosis عند استعمال تراكيز 156و312 مايكروغرام/مل بعد مرور 24 ساعة من المعاملة بالمستخلص وعدم وجود فروق معنوية باختلاف مدد التعريض (24-48-72 ساعة).(Mohammed *et al*.,2010). درست (Mohammed, 2011) تاثير السمية الخلوية للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل خارج

الجسم في الخط السرطاني Laryngeal human carcinoma cell (Hep-2) لوحظت زيادة في عملية الموت المبرمج عـــــند معاملته بالمستخلص المائي بتراكيز (156-10000) مايكروغرام /مل وبمستخلص الكحولي عند معاملته بتراكيز (78-10000) مايكرو غرام/مل، إمـــا الخط السرطاني Human cervical carcinoma cell (Hela) لوحظت زيادة معنوية لعملية الموت المبرمج للخلايا السرطانية عند معاملته بالمســتخلص المائي بتراكيز (312-5000) مايكروغرام/مل وبمستخلص الكحولي بتركيز (78-10000)مايكروغرام/مل خلال 24 ساعة.

درست (Abderrahman,1998) التأثير الخلوي لمستخلص المائي لـــبذور الحرمل *P.harmala* في دليل انقسام Mitotic index الخلايا القمية لجذور نبات الذرة *Zea mays*،إذ بينت النتائج انخفاضا معنويا في دليل الانقسام للخلايا عنـــد معـــاملتها بتراكيز مختلفة (100,50,25,12.5 ملغم/مل) ولوحظ أقوى تأثير في الانقسام عـــــند تركيز 100ملغم /مل ،فضلا عن ظهور اختلالات كروموسومية ومنها الكروموسومات الحلقية، طـور التمـهيدي غير المنتظم ،والجسور في الطور الانفصالي ،الكروموسومات المتأخرة .درست (العبيدي، 2004) تأثير بعض المستخلصات النباتية الخام ومنها نبـــــــات الحرمل *P.harmala* في الخلايا القمية لجذور نبات البصل، بينت الـنتائج انخفاض دليل الانقسام MI ولوحظ حالات اختلالات كروموسومية عند معامـــلتها بتراكيز (50,30,10%) ولمدد التعريض (6,4,2) ساعة.درست (Mekki,2013)التأثير الخلوي للمستخلص المائي والكحولي لـــــــبذور نبات الحرمل *P.harmala* في نبات الباقلاء*Vicia faba* ،إذ بينت النتائج وجود تأثير معنوي للـمستخلص المائي والكحولي في دليل الانقسام MI عند معاملتها بتراكيز100,50,25,12.5(ملغم/مل) فـــــي الأوقات المختلفة(24,12,6,3) ،فضلا عن ظهور تشوهات كروموسومية.

ذكر(Hamouda *et al*., 2000) وجود حالات تسمم لنبات الحرمل في تونس إذ ظـهرت 56 حالة تسمم من سنة 1983إلى 1998 علما ان نسبة الرجال إلى النساء لعمر 26 سنه (2/1) وكانت تأثيرات عصبية بنسبة 91% وتأثيره في الأوعية والقلب 18 % إما تأثيرها في المعدة والأمعاء بنسبة 72 %.

2-6-2- استعمال نبات البصل كنظام بايولوجي للكشف عن السمية الوراثية

استعمل نبات البصل *Allium cepa* لأول مرة كمادة كاشفة مختبريا فـي عام 1938 من قبل العالم Levan خلال بحثه حول تأثيرات الكولجسين Colchicine (Levan,1938). ومنذ ذلك الحين يستعمل اختبار القمم النامية لجذور نبات البصل كنظام أحيائي للكشف عن السمية الوراثية للملوثات البيئية أو المستخلصات النباتية وغيرها ويعود نجاح استعمال هذا النظام لأسباب عديدة منها ان نبات البصل يحتوي على عدد قليل مـن الكروموسومات (16 كروموسوما أي 8 أزواج كروموسومية) فيعطي صورة واضحة للكروموسومات فضلا عن أن نبات البصل يعد من النباتات التي تتمتع بتحـــــسس وكفاءة عالية لتحديد وقياس الاختلالات الكروموسوميه(Rank & Nielsen,1993)، فضلا عـــن سهولة التعامل مع نبات البصل إذ تكون مدة نمو نبات البصل قصيرة لا تستغرق وقتا طويلا مـــــما يساعد الباحث لاجراء تجارب أكثر ،فضلا عن قله الكلفة (FisKesjo,1985; Leme& Marin-Morales,2009; Carita& Marin-Morales ,2008)

أوصت العديد من المنظمات باستعمال النباتات كأحياء اختـبارية Test_organisms منها البرنامج البيئي للأمم المتحدة United Nation Environment Programme (UNEP)، ومنظمة الـصحة العالمية World Health Organization (WHO) ، وكالة حماية البيئة الأميركية United States Environmental Protection Agency (USEPA) (Ma *et al*., 1995).

استعمل هذا النظام *Allium cepa* test في دراسة السمية الوراثية للـعديد مـــــــن المركبات الكيميائية فقد درس (Renjana *et al*.,2013) التأثيرات السمية لمادة Baking powder ومادة Monosodim glutamate .واستعمل هذا النظام في دراسة السمية الوراثية لبعض المستخلصات النباتية، اذ قام (Camparoto *et al*., 2003) بالكشف عن تأثير مستخلص نبات خف الجمل *Bauhinia candicans*. ودرس(Knoll *et al*., 2006) تأثير مستخلص نبات كنكورس *Pterocanulon polystachyum* في جذور نبات البصل. اما (Fachinetto *et al*., 2007) لقد قام بدراسة تأثير مستخلص نبات *Achyrocline satureioides* في خلايا جذور نبات البصل باستعمال طريقة RAPD . قام الباحثون (Olorunfemi *et al*.,2011) بدراسة التأثيرات السمية الخلوية لمستخلص نبات Cassava في جذور البصل. ودرس (Ilbas *et al* ,2012) السمية الخلوية للمستخلص الخام لنبات الصبار *Aloe vera* في جذورالبصل .درس الباحثان (Eren&Ozata ,2014) التأثير السمية الخلوية للمستخلص المائي لنبات الليمون *Limonium globuliferum*.فضـــلا عن استعمال نظام *Allium cepa* test للكشف عن السمية الوراثية للمبيدات Ma *et al*.,1995; Thais *et al*.,2007)، كما استعمل طريقة اختبار نبات البصل *Allium cepa* test كنـــظام اختباري نباتي من

قبل العديد من الباحثين وكانت النتائج التي تم الحصول عليها مشابهة للنتائج عند استعمال الحيوان in vitro كنظام اختباري (Vicentini *et al*., 2001;Teixeira *et al*., 2003).

2-6-3- استعمال المؤشرات الجزيئية في دراسة السمية الوراثية

المؤشرات الجزيئية عبارة عن تتابعات خاصة في الحامض النووي المنقوص الأوكسجين DNA ذات تسلسلات معروفة ومحددة كما توجد في مكان محدد ضمن المجموعة الكروموسومية أو ترتبط بمورثات لها تأثير مظهري معروف وقابل للتميز إذ يمكن استعمالها لتحديد هوية فرد أو خلية تحمل هذه الصفة أو يستعمل كمجس Probe لتعليم النواة أو كروموسوم Chromosome أو موقع وراثي محدد (King & starsfi,1990) وبذلك يمكن الاستدلال بهذه الطريقة للتعرف على مواقع معينة من الكروموسومات أو المجين Genome وتستعمل لتحديد العلاقات الوراثية بين الأفراد لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المميزة للكائنات المختلفة التي تدعى البصمة الوراثية Fingerprint (Patreson and Linda-kaursen,1991).

تم استحداث وايجاد العديد من أنواع مؤشرات الحامض النووي DNA وحاليا يتركز الانتباه على الطرائق المعتمدة على التفاعل تضاعف سلسلة الدنا DNA(PCR) Polymerase chain reaction (Baumung *et al*.,2004)وصف التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA لأول مرة في عام 1985 م من قبل العالم Kary Mullis (Mullis & Fallona,1987), وبعد دراسات مستفيضة لعملية تضاعف الحامض النووي DNA تمكن العالم Kary Mullis وفريقه البحثي من محاكاة عملية التضاعف خارج الأنظمة الحية ولكن مع بعض الاختلافات البسيطة لتظهر تفاعلات التضاعف لسلسلة DNA Polymerase chain reaction (PCR) التي تمثل عملية تضخم Amplification لقطعة محددة من المادة الوراثية DNA اي عمل نسخ كثيرة العدد وبتضاعف لوغاريتمي خارج الأنظمة الحية وذلك يحتاج الى توفير العوامل اللازمة لعملية تضاعف DNA وهي البادئات Primers وأنزيم البلمرة DNA Polymerase ونسبة متساوية من القواعد النايتروجينية Deoxy nucleotide triphosphate (DNTPs)، محلول دارئ ، وايونات ثنائية التكافؤ وهي ايونات المغنيسيوم Mg++ ،أو ايونات أحادية التكافؤ وهي ايونات البوتاسيوم K+ ،فضلا عن قطعة DNA المراد تضخيمها التي يتم الحصول عليها عن طريق استخلاص DNA وهذه المكونات تتفاعل مع بعضها داخل جهاز البلمرة الحراري Thermo cycler machine الذي يعمل على اجراء التفاعلات بين المكونات المذكورة أعلاه ضمن تنسيق حراري محدد وبشكل متعاقب حسب البرنامج المختار (Mullis & Fallona,1987; Altshuler,2006).

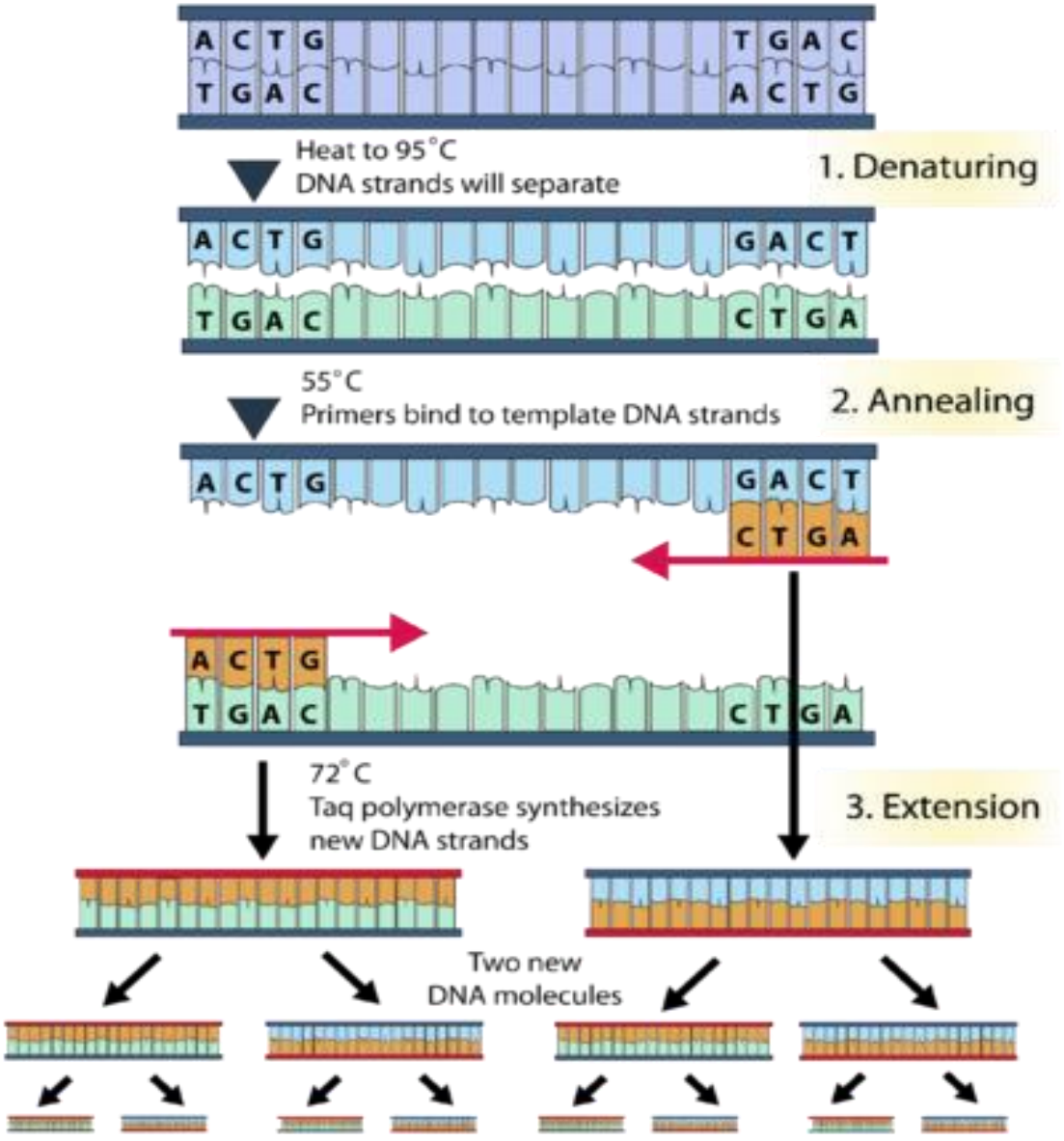
ويحدث التفاعل وفق الخطوات الآتية :-

١- مرحلة مسخ Denaturation DNA step(95-90) م°

٢- مرحلة الالتحام Primers binding , Annealing step (68-50) م°

٣- مرحلة الاستطالة Extension step (72-68) م°

وتعاد هذه الخطوات لمرات عديدة لحين الوصول إلى الكمية المطلوبة من DNA الكافية لعمليات الكشف والدراسة شكل (4)، ويتم الكشف على النواتج التفاعل بوساطة جـــــــــــــــــــهاز الهجرة الكهربائي Gel electrophoresis لتمييز القطع التي يتم تضخيمها ومعرفة أحجامها الجزيئية عن طريق مقارنتها مع القطع DNA معروفة الحجم والوزن الجزيئي Ladder.



شكل (4) خطوات عمل جهاز PCR

2-6-3-1- طريقة التضاعف العشوائي متعدد الاشكال لسلسلة DNA Random amplified polymorphic DNA(RAPD)

تعد من مؤشرات DNA العشوائية المعتمدة عـــلى تضاعف المتسلسل للدنا DNA (PCR) الأكثر انتشارا (Franck & Jha,2006) تحدث مـــن خلال تضاعف مواقع محددة من DNA وذلك باستعمال بادئ عشوائي واحد وبتواجد انزيم البلمرة Taq DNA polymerase ودرجات الحرارة الملائمة إذ ينتج عن هذا التفاعل حزما متضاعفة ذات أوزان جزيئية مختلفة. البادئات المستعملة فـــــي هذه طريقة تتكون من (8 - 10 زوج قاعدة) وتستعمل لتضخيم قطع DNA غـــــــير المعروفة التسلسل والوظيفة، اكتشفت لأول مرة مـــن قـــــــــبل العالـــــــــــــــــمين Welsh و McClelland (Baum *et al*., 1998 ;Welsh & McClelland,1990) .ومن مميزات بادئـــــات تقنية RAPD بأنها ذات تسلسل قصير لا تتجاوز 10 قاعدة نايتروجينية طولا ،عشوائية Random ، مختبرية التصميم ،وتكون غنية بمـحتواها من القواعد G,C بنسبة 40-60%وذلك مـــن اجل ثبات DNA القالب ويكون أكثر استقرارا فضلا عن أنها تعد بادئات عـامة Universal مما يجعل استعمالها على الكائنات الحية المختلفة مثل الانسان والحيوان والنبات والأحياء الدقيقة ، وتعد من المؤشرات ذات السيادة التامة كونها لا يمكن تمييز الاليلات المتماثلة عن غير المتماثلة باستعمال بادئات تقنية RAPD تنتج عدد حزم يتراوح عددها بين 1-10 أو أكثر فـــــــي بـــــــــــــــــــــعض الحالات (Winter & Kahl,1995 ;Williams *et al*.,1990).

أن أهم ما يميز مؤشرات الـ RAPD هو كونها لا تحتاج إلى معرفة مـــــــــسبقة بتتابعات القواعد النايتروجينية للحامض النووي المستهدف ، كـــما أن هذه المؤشرات لا تحتاج إلى نقاوة عالية DNA المستعمل في الطريقة ،كما ان حجما قليلا من المادة الوراثية DNA تكـــون كافية لاعطاء نتائج سريعة ودقيقة فضلا عن سهولة الكشف عنها من خلال ترحيلـها كـهربائيا عـــلى هلام الاكاروز بعد تصبيغها بوساطة الاثيديوم بروماید التي تكون واضحة بـــــــــــعد تعريضها الى الاشعة فوق البنفسجية UV (Reiter *et al*.,1992)، ومن مميزاتها المهمة تـــــــــــــــــكون اقل كلفة من الطرائق الاخرى (Morell *et al*.,1995; Mburu& Hanotte,2005).

استعملت طريقة RAPD لأول مرة من قبل (Williams *et al*., 1990) في العـــديد من الدراسات لتحديد العـــلاقات الوراثية بين الأصناف المختلفة لذلك تعد ذات أهمية واسعة في مجال علم تصنيف النبات الحديث اذ استعملت هذه المؤشرات من قبل العديد من الباحثين لتصنيف النباتات المـــــختلفة ومنها الذرة *Zea mays* L.(Williams *et al*.,1990) والقـمح (Vierling& Nguyen,1992) والطـــــــماطة (Abdel Tawab *et al*.,2003 a) والتوت (Awasthi *et al*.,2004) والنـــــــــــــــخيل

(Askari *et al*.,2003) والشعير (Tinker *et al*.,1993) والكاكاو (Wild *et al*.,1992) والفلفل (Prince *et al*.,1995) والبطاطا (الحسيني وجبرائيل ،2006) إذ يعتمد التصنيف الحديث على المؤشرات الجزيئية فضلا عن الاعتماد على المظهر الخارجي كما يمكن رسم الخرائط الوراثية للنبات اعتمادا على طريقة RAPD اذ قام (Dawson *et al*.,1993 ; Grise *et al*.,1994) برسم الخارطة الوراثية لنبات الشعير لأول مرة.

استعملت مؤشرات RAPD للكشف عن بعض الصفات المرغوبة أو غير المرغوبة المتواجدة في بعض أنواع النباتات مثل صفة مقاومة الأمراض التي تصيب نبات الشعير منها مرض Barley blotch.(Molnar *et al*.,2000;Kutcher *et al*.,1996) فضلا عن صفة مقاومة مرض تقزم الشعير الاصفرBarley yellow (Wang & Zhang,1996 ;Zhang *et al*.,2001) وصفة مقاومة الجفاف في نبات الحنطة (El-Ameen, 2013).استعملت كذلك طريقة RAPD للكشف عن الأمراض الفطرية النباتية Phyto pathogenic fungi من قبل العديد من الباحثين ومنهم (Assunção *et al*.,1999;Martinez-Culebras *et al*.,2002; Afanador-Kafuri *et al*.,2003)

استعملت طريقة المؤشرات الجزيئية RAPD في الكشف عن التأثير السمي لبعض المواد الكيميائية ومنها ($HgCl_2$, H_3BO_3, $K_2Cr_2O_7$ and $ZnSO_4.7H_2O$)على بادرات seedlings نبات الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* L.(Cenkci *et al*.,2009). درس (Taspinar *et al*.,2009)السمية الوراثية لعنصري السيلينوم Selenium والكادميوم Cadmium على خلايا نبات الباقلاء*Visia faba L.* باستعمال طريقة RAPD.

استعملت المؤشرات الجزيئية RAPD للكشف عن السمية الوراثية للعديد من مستخلصات النباتات الطبية إذ درس (Sunar *et al*.,2009) تأثير السمية الوراثية للمستخلص الكحولي لنبات *Verbascum speciosum* schrad في خلايا عرانيص الذرة *Zea mays* L. واستعمل طريقة RAPD ، وبينت النتائج وجود تأثير مطفر في الخلايا من خلال فقدان أو ظهور حزم جديدة عند المعاملة بتركيز 10%.درس (Qari,2010) التأثير السمي على المستوى الخلوي والجزيئي للمستخلص المائي لنبات القسط الهندي *Costus specisus* في خلايا القمم النامية لجذور نبات البصل *Allium cepa* ،اذ بينت النتائج على المستوى الجزيئي باستعمال طريقة RAPD عدم تأثر DNA نبات البصل بالمستخلص المائي وذلك لظهور حزم أحادية الشكل Monomorphic بين جميع العينات المعرضة وغير المعرضة للمستخلص.

استعمل (القرني ،2012) طريقة RAPD للكشف عن السمية الوراثية لأوراق نبات الحرمل على خلايا الجرذان Rats ، وبينت النتائج وجود تأثير مطفر Mutagenic في الخلايا على المستوى الجزيئي من خلال ظهور حزم متباينة الشكل Polymorphic bands.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

MATERIALS AND METHODS

3- المواد وطرائق العمل MATERIALS AND METHODS

3-1 الأجهزة والمواد الكيميائية المستعملة

3-1-1 الأجهزة

الجدول (3-1) الأجهزة المستعملة في الدراسة

ت	الجهاز	الشركة
1	المؤصدة Autoclave	**Gallen kamp**
2	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	**Eppendroff**
3	جهاز التقطير Water distiller	**GFL**
4	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis	**Bioneer**
5	جهاز تصوير الهلام Gel documentation	**Elettrofor**
6	جهاز تعقيم الهواء Laminar air flow hood	**Geprufle Sicherhiet(G.S)**
7	جهاز البلمرة الحراري Thermo cycler machine	**Tc Techne (4000)**
8	جهاز مقياس الاس الهيدروجيني pH meter	**Inolab**
9	حمام مائي هزاز Shaking water bath	**Vision**
10	فرن كهربائي Oven	**Memmert**
11	ماصات دقيقة Micropipettes	**Eppendorf**
13	ميزان حساس Sensitive balance	**Sortorius**
15	هزاز كهربائي Shaker	**Gallan comp**
16	جهاز قياس الكثافة الضوئية UV. Spectrophotometer	**Cecel**
17	الخلاط المغناطيسي ذو الصفيحة الساخنة Hot plate magnetic stirrer	**Biosan**
18	منبذة Vortex	**Bionex**
19	جهاز النانودروب Nanodrop	**Bioneer**

3-1-2- المواد الكيميائية

جدول (3-2) المواد الكيميائية المستعملة في الدراسة

ت	المادة الكيميائية	الشركة
1	كحول اثيلي مطلق Absolute ethyl alcohol	BDH
2	هلام الاكاروز Agarose gel	Bioneer
3	خلات الامونيوم Ammonium acetate	Bioneer
4	كلوروفورم Chloroform	Promega
5	محلول الاستخلاص CTAB Cetyl trimethyl ammonium bromide	BDH
6	ايزوامايل الكحول Isoamyl alcohol	Bio Basic
7	ايزوبروبانول Isoprobanol	GCC
8	كلوريد الصوديوم Sodium Chloride (NaCl)	Bioneer
9	هيدروكسيد الصوديوم Sodium hydroxide (NaOH)	Bioneer
10	ترس حامضي Tris_acid	Bioneer
11	ترس قاعدي Tris_base	Bioneer
12	محلول الترحيل TBE_buffer	Bioneer
13	صبغة التحميل Loading dye(Bromophenol Blue)	Bioneer
14	الكليسرول Glycerol	Bioneer
15	الاثيديوم بروماید Ethedium bromide	Promega
16	البادئات Primers	Promega
17	الدليل الحجمي Ladder DNA	Bioneer
18	PVP Polyvinylpyrrolidone	Bioneer
19	EDTA (Ethylen diamine tetra acetic acid)	Bioneer
20	النتروجين السائل Liquid nitrogen	محلي
21	ميركابتو ايثانول β_Mercaptoethanol	Bioneer

3-2- مصدر بذور نبات الحرمل *P. harmala*

تم الحصول على بذور نبات الحرمل .*P.harmala* L من السوق المحلية .

3-2-1- مصدر نبات البصل *Allium cepa*

استعمل في الدراسة البصل الأبيض *A.cepa* وبأحجام مـــتوسطة ومتماثلة كأداة للاختبار البايولوجي في دراسة السمية الوراثية لمسـتخلصات بذور نبات الحرمل وقد تم الحصول عليه من قبل الهيئة العامة لفحص وتصديق البذور.

3-2-2- تحضير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل

1- غسلت بذور الحرمل وجففت تحت الهواء.

2- طحنت البذور في المطحنة الكهربائية إلى أن أصبحت على شكل مسحوق دقيق .

3- اخذ 100 غم من مسحوق البذور وخلط جيدا مع 500 مليلتر من الماء المـقطر المعقم للمستخلص المائي أو 500 مليلتر من الايثانول 96% للمستخلص الكحولي وترك لمدة 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة مع التـحريك المستمر باستعمال الخلاط المـغناطيسي Magnetic stirrer.

4- رشح المحلول بوساطة (أربع طبقات من الشاش المعقم) ثم وضـــع الراشح في إطباق وترك ليجف بدرجة حرارة الغرفة.

5- اخذت البقايا (الموجودة على الشاش) واستخلصت مرة ثانية بعد وضعها في 500 مل مـــــن الماء المقطر المعقم أو 500 مل من الايثانول 96% لمدة 24 ساعة ورشحـت أيضا وتم تجفيفها.

6- جمع المسحوق الجاف و وضع في قنينة زجاجية مغلقة ومعقمة وحفظ في الثلاجة لـحين الاستعمال (Mekki,2013; Al-Mizrakchi,1998).

3-2-3-اختبار التركيز نصف المؤثر EC50 للمستخلص المائي او الكحولي لبذور الحرمل

حددت التركيز نصف المؤثر (Effective concentration 50%) للمستخلص المـــــــائي أو الكحولي لبذور نبات الحرمل وحسب طريقة (Yildiz *et al*.,2009;Liman *et al*.,2010).تم تنمية بصلات *Allium cepa* بأحجام متجانسة يتراوح قطرها (2-3سم) فـــي الماء المقطر ولمدة 24 ساعة. اختيرت البصلات النامية بشكل جيد وذات جذور متجانسة الأطوال وعرضت إلى تراكيز مخـــــتلفة (200,100,50,25,10,5%) من المستخلص المائي أو الكحولي لبذور الحرمل وبواقع (3) بصلات لكل معاملة فضلا عن معاملة السيطرة (ماء مقطر فقط). تركت المـعاملات لمدة 96 ساعة (16ساعة ضوء و8 ساعات ظلام) وبدرجة حرارة 25 م°±2 ومع مراعاة تبـــديل الماء المقطر والمحاليل الخاصة لكل معـاملة كل 24 ساعة،بعد انتهاء مدة التعريض تم قياس متوسط طول الجذور لثلاثين جذر بصلة من كل معاملة فضلا عن معاملة السيطرة.

3-3-الدراسة الخلوية

3-3-1-المحاليل الكيمائية المستعملة في الدراسة الخلوية

حضرت الصبغة Aceto-orcein حسب (Fukui & Nakayama,1996) كما يأتي

1- مزج 45 مل من حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid مع 55 مل من ماء المقطر المعقم .

2- سخن المزيج إلى درجة الغليان، وضعت 2 غرام من صبغة الاورسين مـع تحريك المزيج لمدة 30 دقيقة من خلال وضعه على Magnetic stirrer.

3- ثم وضع غطاء زجاجي على فوهة الدورق عند الغليان من اجل حصول عمـــــلية تكثيف للحامض ورجوعه مرة أخرى إلى الخليط وهذا يعمل على زيادة عملية المزج .

4 - يرشح المزيج باستعمال ورقة ترشيح Filter paper نوع Whatman (رقم 42) ثم تحفظ في قناني داكنة في الثلاجة.

3-3-2-معاملة جذور نبات البصل بالمستخلص المائي او الكحولي لـــبذور نبات الحرمل للدراسة الخلوية

تم اختيار بصلات ذات أحجام متجانسة قطرها (2_3 سم) ،وتمت ازالة الجذور القديمة بشفرة تشريح ثم وضعت في أنابيب اختبار 50 مليلترا ملئت بالماء المقطر ويراعى تغطيس قاعدة البصلة في الماء بشكل جيد .تركـــت لمدة 24 ساعة (16ساعة ضوء و8 ساعات ظلام) وبدرجة حرارة 25 م°±2.

تم اختيار البصلات التي نمت جذورها بشكل جيد وبأطول متماثلة (1- 1.5) سم واســـــــــــتبعدت البصلات غير النامية ضمن هذا المدى .تم تعريض البصلات النامية إلى تراكيز مخـــــتلفة (10 ، 25 ، 50، 100، 200 %) من المستخلص المائي أو الكحولي واختيرت (اعتمادا على نتائج التركيز نصف المؤثر EC50) ،وبواقع (6) مكررات لكل معاملة ولكل مدة تعريض ، فضلا عن 6 مكررات لمعاملة السيطرة (ماء مقطر فقط)، مع مراعاة وجود معاملة السيطرة لكل مدة تعريض .تم جمع (15) جذرا من كل معاملة بعد 24، 48 ، 72 ساعة لأجل فحصها خلويا (Fiskesjo,1985).

3-3-3- التثبيت والحفظ

وضعت الجذور المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي أو الكحولي وحسب المدد الزمنية كلا على حده في المحلول المثبت والمتكون من خلط ثلاثة أجزاء من كحول اثيلي 100% إلى جزء مـــن حامض الخليك الثلجي لمدة 24 ساعة، وبعد انتهاء مدة التثبيت تم غسل الجذور مرتين بالكحول الاثيلي 70% ولمدة ساعة عند كل معاملة غسل ثم حفظت الجذور بالكحول الاثيلي 70 % وفـــي درجة حرارة 4° م لحين الاستعمال .

3-3-4- الفحص الخلوي

تغسل الجذور المحفوظة بالكحول الاثيلي 70% بالماء المقطر عدة مرات ثم تنقل إلى محلول حامض الهايدروكلوريك (1N) HCl وتوضع في الحمام المائي بدرجة حرارة 60 ° م ولمدة (15) دقيقة وذلك لتطرية الجذور. غسلت الجذور باستعمال الكحول الاثيلي 70% ثم يتم وضعها على شريحة زجاجية نظيفة ويتم ازالة الأجزاء الزائدة من الجذر وإبقاء 2 ملم من القمة النامية Root tip فقط و وضعت قطرتين مـن صبغة الاسيتو اورسين Aceto-orcein على العينة وتترك لمدة دقيقتين ثم يوضع غطاء الشريحة فوقها ويتم الضغط بخفة لهرسها ثم تفرش باستعمال مؤخرة قلم الرصاص وتم فحص العينات مباشرة بوساطة المجهر الضوئي نوع (Olympus)

تم فحص 1000 خلية للشريحة الواحدة وفي مناطق مختلفة منها علما أن مجـــــموع الخلايا التي تم فحصها في التركيز الواحد في المدة الزمنية الواحدة 5000 خلية، تم تسجيل عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة وعدد خلايا كل طور من أطوار الانقسام الخلوي ورصدت جميع حالات الشذوذ الكروموسومية وتم تصويرها بكاميرا نوع (Amscope 10 MP).

3-3-5-التحليل الاحصائي لنتائج الدراسة الخلوية

تم استعمال برنامج SPSS V. 15.0 لتحليل البيانات في الدراسة الخلوية باستعمال تحـــــليل التباين باتجاه واحد One Way ANOVA لايجاد الفروق المعنوية باعتماد الخطأ القياسي تحت مستوى معنوية ($P< 0.05$)

تم حساب دليل الانقسام Mitotic Index (MI) حـــــــــــــــسب (Love & Love,1975; Sehgal *et al*.,2006):

دليل الانقسام Mitotic Index = عدد الخلايا المنقسمة / العدد الكلي للخلايا × 100

تم حـــــــساب دليـــــــــل الطور Phase Index وحسب (Becker,1986):

دليل الطور Phase Index = عدد خلايا الطور /عدد الخلايا المنقسمة الكلي × 100

تم حساب النسبة المئوية للشذوذ الكروموسومي Chromosomal aberration حـــــــــسب (Ozmen & Summer,2004)

النسبة المئوية للشذوذ الكروموسومي = عدد الخلايا الشاذة / عدد الخلايا الكلي المنقسمة × 100

3-4- الدراسة الجزيئية

3-4-1- معاملة جذور نبات البصل بالمستخلص المائي او الكحولي لبذور نبات الحرمل للدراسة الجزيئية

تم اختيار بصلات ذات أحجام متوسطة قطرها (2_3 سم) وتمت ازالة الجذور القديمة بشفرة تشريح ثم وضعت في أنابيب اختبار ملئت بالماء المقطر مع مراعاة تغطيس قاعدة البصلة في الماء جيدا وتركت لمدة 24 ساعه (16ساعة ضوء و8 ساعات ظلام) وبدرجة حرارة 25 م°±2.

تم اختيار بصلات نامية بشكل جيد وبأطوال جذور متماثلة تقريبا (1-1.5) سم وعرضت الى التراكيز نفسها التي استعملت في الدراسة الخلوية من المستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل فضلا عن معاملة السيطرة (ماء مقطر فقط) وتركت لمدة 7 ايام مع تغير محلول المعاملة كل 24 ساعة، جمعت الجذور ثم حفظت في درجة حرارة 20- °م لحين الاستعمال (الغيثار،2007).

3-4-2- استخلاص الحامض النووي DNA Extraction

تمت عمليات عزل الدنا Genomic DNA من جذور نبات البصل *Allium cepa* L. المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل وذلك عـــلى طريق الاستخلاص المعتمدة على CTAB والمعتمدة على طريقة (Weigand *et al*., 1993).

3-4-2-1- المحاليل المستعملة في استخلاص الحامض النووي DNA

أ- محلول الاستخلاص

ت	المادة		التركيز
1	كلوريد الصوديوم	NaCl	1.4 مولر
2	ترس حامضي	Tris-Hcl, pH=8	0.1 مولر
3	Ethylene diamine tetraacetic acid	EDTA	20 ملي مولر
4	Cetyl trimethyl ammonium bromide	CTAB	2%
5	Polyvinylpyrrolidone	PVP	1%
6	ميركابتو ايثانول	β-mercaptoethanol	1%

تم تحضير المحلول بإضافة الماء المقطر المعقم بالمؤصدة لمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 121م° وتحت ضغط 15 جو/سم3

ب- كحول الايزوامايل / كلوروفورم

ويحضر المحلول بنسبة 24 حجم من الكلوروفورم : 1حجم من كحول الايزوامايل و يحفظ داخل قنينة محكمه الغلق ومعقمة عند درجة حرارة 4 م°.

ت- محلول الغسل

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

ويكمل الحجم بالماء المقطر المعقم .

ث- محلول الاذابة TE buffer

يتم تحضير محلول الاذابة عن طريق اذابة المواد أدناه في الماء المقطر ثم يتم التعقيم بالموصدة

ت	المادة		التركيز ملي مولر
1	ترس القاعدي	Tris_base	10
2	(EDTA)	Ethylendiaminetetraacetic acid	1

3-4-2-2- طريقة استخلاص DNA

تمت عملية استخلاص الحامض النووي Genomic DNA ن جذور نبات البصل التي تم معاملتها مسبقا بالمستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل وذلك وفقا لطريقة (Weigand *et al*.,1993).

- طحن (2-3) غم من جذور نبات البصل في هاون خزفي بعد اضافة كمية من مادة النتروجين السائل،إلى أن يصبح النسيج النباتي بشكل مسحوق ابيض

- تنقل العينات المسحوقة إلى أنابيب مختبريه بحجم 50 مليلتر ويضاف لها 10 مليلترات من محلول الاستخلاص الساخن بدرجة حرارة 65°م وتوضع في الحمام المائي الهزاز وبدرجة حرارة 65 °م ولمدة 90 دقيقه.

- بعد مدة الحضن تترك الأنابيب لمدة حتى تكتسب درجة حرارة الغرفة ثم يتم اضافة 6 مليلترات من محلول الكلوروفورم/ايزوامايل لكل أنبوب ويتم تحريك الأنبوب بهدوء باليد لمدة 15 دقيقة .

- نبذت العينات باستعمال جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 4000 دورة/دقيقة ولمدة 20 دقيقة وتنقل الطبقة الشفافة العليا من كل انبوب بعد النبذ الى انبوبة جديدة ويتم اضافة حجم مساو من مادة الايزوبروبانول المبرد Cold isopropanol لكل عينة ويتم مزجها بالتقليب لحين ظهور كتله كثيفة ذات لون ابيض التي تمثل خيوط الدناDNA ويترك إلى اليوم التالي في حال عدم ظهور خيوط DNA .

- تنبذ العينات بسرعة 4000 دورة / دقيقة ولمدة 20 دقيقة لغرض ترسيب الدناDNA.

- تغسل خيوط الدناDNA بمحلول الغسل ثم تنبذ بسرعة 4000 دوره/ دقيقة ولمدة 10 دقائق ويتم التخلص من محلول الغسل وذلك بقلب الأنابيب على ورقة ترشيح لمدة 10-15 دقيقة لغرض التجفيف والتخلص من محلول الغسل .

- بعد جفاف العينات يتم إضافة (100-200 مايكروليتر) من محلول الاذابة وثم تقليبها بخفة لحين ذوبان خيوط DNA ثم يتم حفظها بدرجة -20 م° لحين اجراء التحليلات اللاحقة .

3-4-2-3- قياس تركيز DNA وتقدير نقاوته

قيس تركيز الدناDNA حسب ما ذكر (Sambroak *et al*.,1989) وذلك بتخفيف عـينة الدنا DNA مئة مرة بمحلول الاذابة ثم توضع فـي جهاز الكثافة الضوئية Spectrophotometer ويتم قراءة امتصاص العينة المخففة للأشعة فوق البنفسجية عند الطولين الموجيين 280,260 نانوميترا ويتم حساب تركيز DNA وحسب المعادلة أدناه :

تركيز DNA /ملليتر=مقدار امتصاص الدناDNA عند الطول الموجي 260/ معكوس التخفيف ×50

نقاوة DNA = الامتصاصية عند الطول الموجي 260/الامتصاصية عند الطول الموجي 280

ثم تقدير نوعية الحامض النووي المنقوص الاوكسجين DNA عن طريق ترحيل عينات الدناDNA على هلام الاكاروز 1% وبالتوازي مع الدليل الحجمي Ladder DNA يتراوح أحجامه مـــــن 100_2000 زوج قاعدة، وقد تم التأكد من تركيز ونقاوة الدنا DNA بـــقياسها بجهاز النانودروب Nanodrop.

3-4-3- الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز

3-4-3-1-المحاليل المستعملة في ترحيل DNA على هلام الاكاروز

حضرت المحاليل وفقا لطريقة (Sambroak *et al*.,1989)

ا- محلول TBE(Tris-boric acid-EDTA) بقوه ×10

ت	المكونات		التركيز/مولر
1	حامض البوريك	Boric acid	0.89
2	ترس قاعدي	Tris-base	0.89
3	Ethylene diamine tetraacetic acid	EDTA	0.02

يحضر واحد لتر من المحلول ويخفف عند الاستعمال(10) مرات بالماء المقطر للحصول على محلول TBE بقوة (×1) ويعدل الرقم الهيدروجيني pH الى (8.2) ويعقم في الموصدة.

ب_ محلول التحميل بقوة ×6

ت	المكونات		الكمية
1	صبغة بروموفينول الزرقاء	Bromophenol blue	0.25 غرام
2	كليسرول	Glycerol	50 ملليتر

يتم أكمال الحجم بالماء المقطر ليصبح (100) ملليتر الحجم النهائي ويتم تعديل الرقم الهيدروجيني الى 8 عن طريق استعمال مادة هيدروكسيد الصوديوم ويحفظ بدرجة حرارة 4 °م.

3-4-3-2- خطوات ترحيل عينات DNA في جهاز الهجرة الكهربائية

- يتم تحضير هلام الاكاروز بتركيز1% وذلك باضافة 1غرام من الاكاروز الى 100 مليلتر من محلول TBE (×1)ويسخن المزيج مع التحريك المستمر الى ان تكتمل الاذابة ثم يبرد إلى درجة حرارة (50-55) °م بعدها يتم اضافة 2 مايكروليتر من بروميد الاثيديوم الى المزيج .

- يسكب الهلام برفق وبشكل مستمر في لوح التحميل الخاص بجهاز الهجرة الكهربائية وتزال بالماصة الفقاعات ان وجدت ويترك الهلام الى ان يتصلب في درجة حرارة الغرفة.

- بعد ان يتصلب الهلام يوضع لوح التحميل داخل حوض جهاز الهجرة الكهربائي ويغمر بمحلول TBE (×1) ثم يرفع المشط بهدوء.

- يتم مزج عينة الدنا DNA مع محلول التحميل بنسبة 3:1 تحمل العينات في داخل الحفر ويراعى عدم خروج العينة من الحفرة اثناء التحميل بعد ذلك يحمل الدليل الحجمي.

- يتم توصيل التيار الكهربائي ويجهز بقدرة من 1-3 فولت/سم وبعد وصول محلول التحميل الازرق الى ما قبل نهاية الهلام يتم ايقاف جهاز الهجرة الكهربائية.

- يفحص هلام الاكاروز في جهاز الاشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي 240 نانوميترا للكشف عن حزم الدنا DNA ويصور الهلام باستعمال كاميرا نوع Nikon D600 (Sambroak *et al*.,1989)

3-4-4- تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA Random amplified polymorphic DNA(RAPD)

3-4-4-1-المحاليل المستعملة في تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA

أ- البادئات العشوائية Primers مجهزة من شركة Promega التي تم اختيارها اعتمادا على (Hassan & Yassein,2014)

جدول (3-3) البادئات العشوائية التي تم استعمالها لتفاعلات RAPD مع تتابعاتها

ت	البادئ	تسلسلات البادئ
1	OPA-1	5´-CAGGCCCTTC- 3´
2	OPA-2	5´-TGCCGAGCTG- 3´
3	OPA-3	5´-AGTCAGCCAC- 3´
4	OPA-4	5´-AATCGGCGTC- 3´
5	OPA-5	5´-AGGGGTCTTG- 3´
6	OPA-6	5´-GCTCCCTGAC- 3´
7	OPA-7	5´-GAAACGGGTG- 3´
8	OPA-8	5´-GTGACGTAGG- 3´
9	OPA-9	5´-GGGTAACGCC- 3´
10	OPA-10	5´-GTGATCGCAG- 3´

ب- خليط التفاعل الرئيس Master mix

تم تجهيز المادة من شركة Bioneer الذي يحتوي على :-

ت	المواد	حجم التفاعل مايكروليتر
1	Top DNA polymerase	1 U وحده واحدة
2	Tris_HCl (pH=9.0)	10 مايكرومولار
3	KCl	30
4	$MgCl_2$	1.5
5	dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250
6	Stabilizer & tracking dye	---------

3-4-4-2- تقانة التضاعف العشوائي متعدد الأشكال لسلسلة DNA (RAPD)

يتم العمل داخل جهاز تعقيم الهواء Laminar air flow hood وبارتداء القفازات اي يكون محيط العمل معقما وتكون المحاليل جميعها تم حفظها على الثلج.

تحضير خليط تفاعل PCR المتكون من المواد الآتية :

ت	المكونات	حجم العينة واحدة/ مايكروليتر	التركيز النهائي
1	Bioneer master mix	5	1×
2	عينة DNA	5	100نانوغرام/مليلتر
3	البادئ العشوائي	2	10 بيكومول
4	ماء مقطر معقم	13	------

يكون الحجم النهائي (25) مايكروليتر لكل انبوبة يتم نبذ المزيج جيدا بالمنبذة لعدة ثوان وتوضع في جهاز البلمرة الحراري PCR ويتم تنفيذ البرنامج الأتي

ت	الخطوات	درجة الحرارة / م°	المدة الزمنية / دقيقة	عدد الدورات
1	Initial denaturation	95	4	دورة واحدة
2	Denaturation	94	30 ثانية	
3	Annealing	36	1	40 دورة
4	Extension	72	1	
5	Final extension	72	10	دورة واحدة

بعد انتهاء البرنامج ترفع الانابيب من جهاز البلمرة PCR ويجرى ترحيل الناتج على هلام الاكاروز بتركيز 1.5 % وبفولتية 1_3 فولت/سم مع مؤشر الدليل الحجمي Ladder ولمدة ساعتين ثم يتم التصبيغ بصبغة بروميد الاثيديوم ويفحص بجهاز توثيق الهلام Gel documentation system ويتم تصويره بكاميرا نوع Nikon D600 .

3-4-4-3- التحليل الاحصائي لنتائج الدراسة الجزيئية

تحليل نتائج مؤشرات RAPD

تم قراءة حزم الحامض النووي المنقوص الاوكسجين DNA الظاهرة في هلام الاكاروز ورمز لوجود الحزمة برقم (1) ولعدم وجود الحزمة برقم (0) لغرض رسم شجرة القرابة بين العينات المدروسة وفقا لمعامل Jaccard التشابه الوراثي وباستعمال برنامج PAST ver.1.91 (Hammer *et al*.,2001).

اعتمادا على المعلومات الأولية المستنبطة من RAPD حسبت نسبة الاستقرار الجينوم GTS % Genomic template stability من خلال المعادلة الآتية:

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

إذ أن:

n= عدد الحزم الكلية في معاملة السيطرة عند البادئ نفسه

a= عدد الحزم متعددة الاشكال للبادئ Polymorphic band

(Duman *et al*.,2015 ; Liu *et al*., 2007; Liu *et al*.,2005).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

RESULTS AND DISCUSSION

4- النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

4-1-النتائج Results

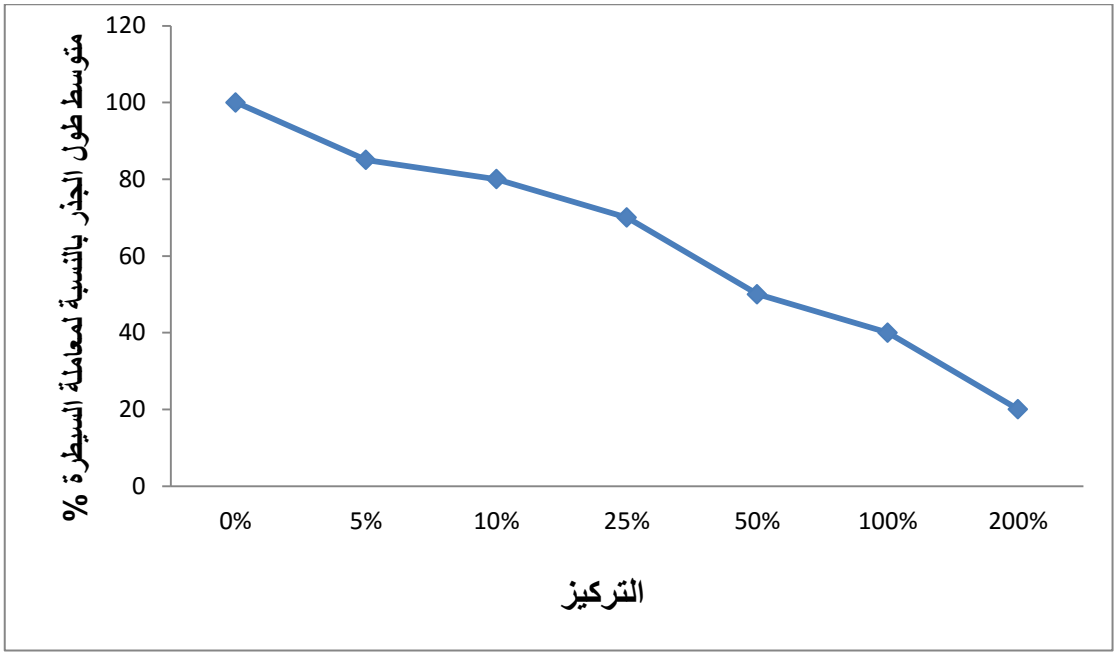
4-1-1- تأثير مستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل

تم تعريض جذور نبات البصل *A.cepa* لتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل *P.harmala* لمدة 96 ساعة لدراسة تأثيرها في متوسط طول جذور، ومـن ثم تحديد التركيز نصف المؤثر EC_{50} .

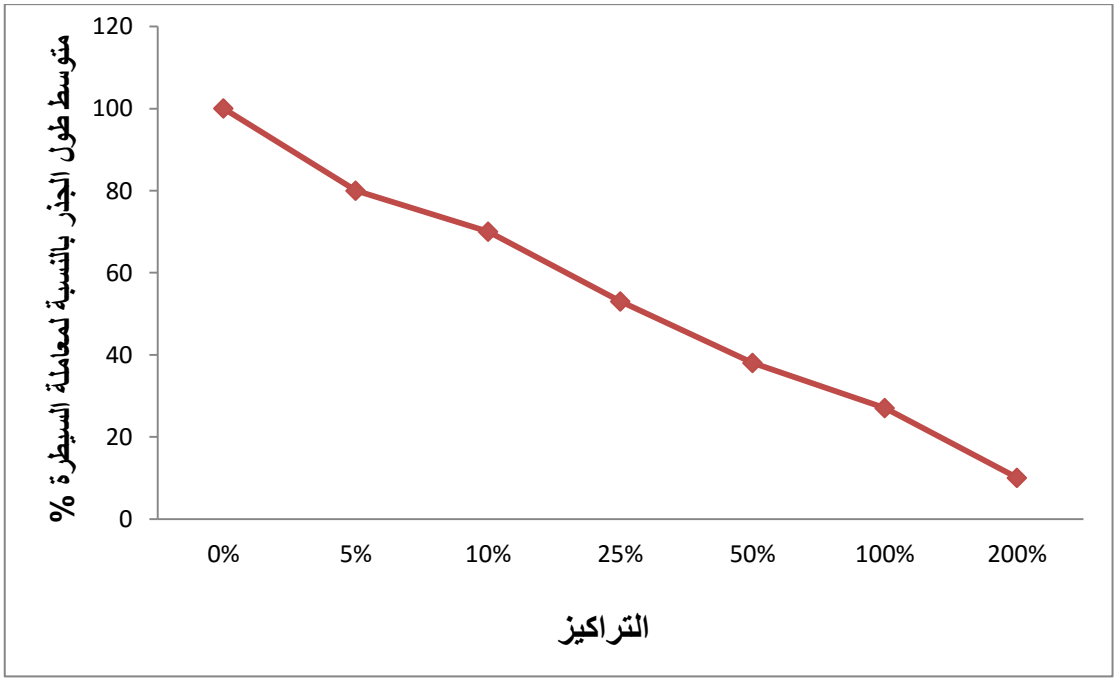
توضح الاشكال (2,1) تأثير المستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل في متوسط طول جذور نبات البصل ويتضح بشكل عام بان مستخلصات بذور نبات الحرمل المائية والكحولية قـــد ثبطت معنويا متوسط طول الجذور مقارنة بمعاملة السيطرة ، وقـــد ازداد تثبيط طول الجذور كلما زادت تراكيز المستخلصات. أوضح الشكل (1) بان أعلى تثبيط في متوسط طول جذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل كان عند تركيز 200 % إذ ثبط طول الجذر بنسبة 76% ،إما التركيز50% مـــن المستخلص المائي فقد ثبط طول جذور البصل بنسبة 50% مقارنة بمعاملة السيطرة لذا عد التركيز 50% مـن المستخلص المائي التركيز نصف المؤثر في متوسط طول جذور نبات البصل EC_{50}.

يبين الشكل (2) بان المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل ثبط معنويا متوسط طول جذور نبات البصل وكان أعلى مستوى للتثبيط عند التركيز200 % إذ كانت نسبة التثبيط 87.3% مقارنة بمعاملة السيطرة بينما كانت اقل نسبة تثبيط عند التركيز 5% من المستخلص الكحولي إذ ثبط طول الجذر بنسبة 20 % مقارنة بمعاملة السيطرة ، يوضح الـــشكل كذلك بان التركيز نصف المؤثر EC_{50} لمتوسط طول جذور نبات البصل للمستخلص الكحولي كان 25 % إذ ثبط بنسبة 50% مقارنة بمعاملة السيطرة .

يتضح من قيمة التركيز نصف المؤثر EC_{50} أن المستخلص الكحولي كان أكثر تأثيرا وسمية في نمو جذور نبات البصل من المستخلص المائي اذ كان EC50 (50 % ، 25%) للمستخلص المائي والكحولي على التوالي.اعتمادا على هذه النتائج فقد تم اختيار التراكيز الآتية 10، 25، 50، 100، 200% مـــــن المستخلصين المائي و الكحولي لبذور نبـات الحرمل .*P.harmala* L من اجل دراسة تأثيراتها في جذور نبات البصل خلويا وجزيئيا.



شكل (1) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل *A.cepa*



شكل (2) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل *A.cepa*

4-1-2- الدراسة الخلوية

4-1-2-1تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في دليل الانقسام MI

يبين الجدول (4-1) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* في دليل الانقسام MI في القمم النامية لجذور نبات البصل. إذ تم تعريض جذور نبات البصل لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي 10، 25، 50، 100، 200 % ولمدة التعريض (24، 48، 72)ساعه.

توضح النتائج بان المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل أدى إلى انخفاض معنوي في دليل الانقسام ولجميع التراكيز المستعملة،ولوحظ كذلك إن دليل الانقسام يستمر بالانخفاض كلما زاد تركيز المستخلص إذ وصل أعلى انخفاض عند التركيز200 % فاصبح دليل الانقسام 2.27 بعد 24 ساعة مقارنة بالسيطرة اذ كان دليل الانقسام 10.59 اي بنسبة انخفاض 78.7% ، إما اقل تأثير معنوي للمستخلص المائي في دليل الانقسام كان عند اقل تركيز 10% اذ اصبح 7.47 بعد 24 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 10.59 اي بنسبة انخفاض تعادل 29% إما التركيز نصف المؤثر للمستخلص المائي 50% فقد اصبح دليل الانقسام 5.57 بعد 24 ساعة أي بنسبة انخفاض تعادل 47.4% مقارنة بمعاملة السيطرة جدول (4-1) ، شكل (3).

يتضح كذلك بان دليل الانقسام لجذور نبات البصل المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور الحرمل لم يتأثر كثيرا بزيادة مدة التعريض ، إذ كان دليل الانقسام 7.47 عند التركيز 10% بعد 24 ساعة تعريض اي بنسبة انخفاض تعادل 29.4% وأصبح 5.86 عند التركيز نفسه بعد 48 ساعة تعريض اي بنسبة انخفاض 23.5 % مقارنة بمعاملة السيطرة اما عند مدة التعريض 72 ساعة فقد أصبح 5.91 اي بنسبة انخفاض 21% جدول (4-1) ، شكل (3).

أشار (Antonsie –wiez,1990) بان انخفاض دليل الانقسام MI الى 22% او دون ذلك من معاملة السيطرة فقد يسبب تأثيرات مميتة Lethal effect للكائن الحي . إما (Sharma ,1983) أوضح بان انخفاض دليل الانقسام MI الى 50% أو دون ذلك فقد يكون ذا تأثير شبه مميت وتدعي هذه النسبة حد السمية الخلوية Cytotoxic threshold.لذا اعتمادا على نتائج السابقة يمكن اعتبار التركيز 100% تقريبا تركيزا شبة مميت من المستخلص المائي والتركيز 200% تقريبا تركيزا مميتا من المستخلص نفسه.

يتضح كذلك تأثير المستخلص الكحولي في دليل الانقسام MI لجذور نبات البصل، تبين من النتائج بان المستخلص الكحولي للحرمل أدى إلى انخفاض معنوي في دليل الانقسام MI ولجميع التراكيز المستعملة ،ولوحظ أن دليل الانقسام MI يستمر بالانخفاض كلما زادت تراكيز المستخلص الكحولي وكان اقل

تأثير للمستخلص الكحولي في دليل الانقسام عند التركيز 10 % إذ أصبح 6.59 بـــــعد 24 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة وكان 11.71 اي بنسبة انخفاض تعادل 43% وإما أعلى تأثير للمستخلص الكحولي فكان عند التركيز 200% إذ أصبح دليل الانقسام 2.39ولمدة التعريض نفسها أي بنسبة انخفاض تـصل 79.59% إما عند التركيز25 % للمستخلص المائي(التركيز نصف المؤثر) فـــقد أصبح دليل الانقسام 4.39 بـعد 24 ساعة اي بنسبة انخفاض 62.5 % مقارنة بمعاملة السيطرة 11.71. اعتمادا على هذه النتائج يمكن عد التركيز 25% تقريبا تركيزا شبه مميت مـــن المستخلص الكحولي والتركيز 200% تقريبا التركيز المميت من المستخلص نفسه جدول (4-2) ، شكل (4).

يتضح كذلك بان دليل الانقسام لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكـــــحولي لم يتأثر كثيرا بزيادة مدة التعريض إذ كان دليل الانقسام في التركيز25% التركيز نصف المؤثر EC_{50} بعد 48 ساعة 4.77 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 8.86 أي بنسبة انخفاض 46% ،أما بعد مرور 72 ساعة فقد كان دليل الانقسام 4.44 مقارنة بالسيطرة وكانت 7.73 اي بنسبة انخفاض 42.5 % جـــــدول (4-2)، شكل(4) .

4-1-2-2- تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في دليل الأطوار الانقسام المايتوزي

أولا: **دليل الطور التمهيدي Prophase**

يتضح من الجدول (4 -1) والأشكال (6 ، 7 ،8) بان دليل الطور التمهيدي قد انخفض معنويا في الجذور المـــعاملة بالمستخلص المائي لبذور الحرمل ابتداءً من التركيز25 % وحتى أعلى تركيز 200%، بينما لم يتأثر معنويا عند التركيز 10% ولجميع مـــــــــــــــدد التعريض اذ اصبح 57.51، 56.48، 52.6 عند مدة التعريض 24، 48، 72 ساعة على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 57.9 ،56.87 ،54.01 على التوالي. لوحظ كذلك بان انخفاض دليل الطور التمهيدي يتناسب طرديا مع تركيز المستخلص المائي إذ كان أعلى انخفاض عـــــــــند التركيز 200% إذ أصبح 33.3، 31.48، 30.81 عند مدة التعريض 24،48 ،72 ساعة على التوالي مـــقارنة بمعاملات السيطرة، واقل انخفاض معنوي عند التركيز 25% إذ اصبح 50.5 ، 52.99 ، 47.28 عند مدة العريض 24، 48 ، 72 ساعة على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة .

يوضح الجدول (4-2) والأشكال (10،9،8) بان دليل الطور التمهيدي للجذور الـمعرضة للمســتخلص الكـحولي قد انخفض بشكل معنوي أيضا ابتداءً من تركيز 25 % وعند جميع مدد التعريض 24 ، 48 ، 72 ساعة بينما لم يتأثر عند التركيز 10% .وان قيمة دليل الطور التمهيدي تتناسب طرديا مع

تركيز المستخلص الكحولي المستعمل إذ كان أعلى انخفاض معنوي في دليل الطور التمهيدي عند التركيز 200% إذ اصبح31.01، 28.08، 26.30عند مدة التعريض24،48،72 ساعه على التوالي مقارنة بمعاملات السيطرة التي كانت 54.35، 50.28، 56.25 على التوالي. واقل انخفاض معنوي عند التركيز ٢٥% إذ اصبح 42.72، 39.10 ، 37.43عند مدة التعريض 24 ، 48 ، 72 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة .

ثانيا: **دليل الطور الاستوائي Metaphase**

يتضح من الجدول (4 -1) والأشكال (5، 6 ، 7) أن دليل الطور الاستوائي للجذور المعرضة للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل قد ارتفع بشكل معنوي مقارنة بمعاملات السيطرة ابتداءً من التركيز50% (التركيز نصف المؤثرEC_{50}) وحتى تركيز 200 % وخلال مدة التعريض 24،48،72 ساعه .لوحظ كذلك بان ارتفاع قيمة دليل الطور الاستوائي تتناسب طرديا مع تركيز المستخلص المائي، اذ كـــان اقل ارتفاع لدليل الطور الاستوائي عند التركيز 10% إذ أصبح 24.11،21.69،23.97 عند مدة التعريض 24،48،72 ساعه على التوالي مقارنه بمعاملة السيطرة 18.99، 19.78، 20.04 على التوالي وأما أعلى ارتفاع لدليل الطور الاستوائي فكان عند التركيز 200 % إذ اصبح 38.31، 39.76، 46.39 عـــند مدة التعريض 24، 48 ، 72 ساعة على التوالي مقارنة مع بمعاملات السيطرة.

يوضح الجدول (4 -2) والأشكال (8،9،10) بان دليل الطور الاستوائي للجذور المعرضة للمستخلص الكحولي قـــد ارتفع بشكل معنوي ولجميع التراكيز المستعملة وابتداءً من التركيز 10% وحتى أعلى تركيز مستعمل وعند جميع مدد التعريض 24 ، 48 ، 72 ساعة ولـــــوحظ كذلك بان ارتفاع قيمة دليل الطور الاستوائي تتناسب طرديا مع تركيز المستخلص الكحولي إذ كان أعلى ارتفاع لدليل الطور الاستوائي عـند التركيز200% إذ اصبح 42.27،44.31،50.3 عند مدة التعريض 24،48،72 ساعة على التوالي مـــقارنة بمعاملة السيطرة اذ كانت 20.73، 21.71،21.52على التوالي.

ثالثا: **دليل الطور الانفصالي Anaphase**

يتضح من الجدول (4 -1) والأشكال (5،6،8) أن دلـــيل الطور الانفصالي لم يتأثر بالمستخلص المائي عند التراكيز 10،25،50 % باختلاف مدة التعريض والتركيز 100 % لمدة التعريض 72 ساعة ولـــكنه ارتفع معنويا عند التركيزين 100،200 % ولمدتي التعريض 24 ، 48 ساعة و 200% عند مدة التعريض 72 ساعة إذ أصبح 20.92، 16.96عند التركيز100%عند مدة التعريض 48,24 ساعة على التوالي مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 11.97،12.75على التوالي. اما عـــــند التركيز 200%

فأصبحت 19.04،17.63،18.78عـــــــند مدة التعريض 24، 48،72 ساعة على التوالي مقارنة بمعاملات السيطرة التي كانت 11.97 ، 12.75 ،12.18 على التوالي .

يوضح الجدول (4-2) والأشكال (8،9،10) أن المستخلص الكحولي لم يـؤثر معنويا في قيمة دليل الطور الانفصالي لجذور نبات البصل عند جميع التراكيز وباختلاف مدة التعريض مـــــا عدا التركيزين 50 ، 200 % ولمدتي التعريض 24، 48 ساعة فاصبح دليـــــــل الطور الانفصالي عند هاتين التركيزين 19.04،17.10 على التوالي بعد 24 ساعة مقارنة مع معامل السيطرة التي كانت 13.3 ،وبلغت القيمة 21.28،20.09 عـــــند التركيزين نفسها بعد 48 ساعه مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 13.85 .

رابعا: **دليل الطور النهائي Telophase**

يوضح الجدول (4 -1) والاشكال (5،6،7) بان دليل الطور النهائي لم يتأثر معنويا بجميع التراكيز المستعملة من المستخلص المائي والكحولي ولجميع مدد التعريض ما عدا عند التركيز 10% بعد مدتي التعريض 24،72 ساعة لوحظ انخفاض معنوي لدليل الطور النهائي إذ اصـــــبح 6.48،8.11 عند مدتي التعريض 24،72 ساعه على التوالي مقارنة بمعاملتي السيطرة التي كانت 11.14، 13.76 على التوالي.

يوضح الجدول (4 -2) والأشكال (8،9،10) بان دليل الطور النهائي لعيـــــــنات جذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لم تتأثر معنويا عند جميع التراكيز المستعملة للمستخلص ما عدا ظهور انخفاض معنوي عند التركيز 200% بعد 48،72 ساعة إذ اصبح دليل الطور النهائي 7.51 في الجذور المعاملة بالتركيز 200% بعد 48 ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 10.06 وإما بعد 72 ساعة فقد اصبح دليل الطور النهائي 7.25 مقارنة بمعاملة السيطرة التي كانت 10.17 .

جدول (4 -1) دليل أطوار الانقسام المايتوزي ودليل الانقسام (MI) لجذور نبات الـــــــبصل المعرضة للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل.

مدة التعريض	التركيز	دليل الأطوار % متوسط ± الخطأ القياسي				
		الطور التمهيدي Prophase	الطور الاستوائي Metaphase	الطور الانفصالي Anaphase	الطور النهائي Telophase	دليل الانقسام MI
24 ساعه	السيطرة	**3.35±57.92**	**1.72 ± 18.94**	**1.6 ± 11.97**	**1.6 ± 11.14**	**1.71± 10.59**
	%10	2.14± 57.15	1.94 ± 23.97	1.8 ± 12.38	1.8 ± 6.48*	1.29± 7.47*
	%25	1.68±50.5*	1.22 ± 25.18	1.5 ± 14.11	1.3 ± 10.21	1.62± 6.66*
	%50	2.50 ±48.7*	2.89 ± 28.85**	1.7 ± 13.29	1.8 ± 9.07	1.30± 5.57*
	%100	1.96 ±34.4*	3.18 ± 34.02**	2.4 ± 20.92**	1.9 ± 10.66	1.18±4.07*
	%200	1.43 ±33.3*	4.15 ± 38.31**	1.6 ±18.78**	1.2 ± 9.61	1.16± 2.27*
48 ساعه	السيطرة	**3.6 ±56.87**	**1.9 ± 19.78**	**2.4 ±12.75**	**1.3 ± 10.59**	**1.81±7.67**
	%10	3.0 ±56.48	1.4 ± 21.69	1.2 ± 11.88	1.6 ± 9.94	1.22± 5.86*
	%25	1.1 ±52.99	1.7 ± 22.15	1.8 ±12.36	1.4± 12.49	1.31± 5.75*
	%50	1.3 ±45.05*	1.9 ± 33.29**	1.3 ±12.25	1.3 ± 9.40	1.15± 5.41*
	%100	2.1 ±38.71*	2.6 ± 35.86**	2.0 ± 16.96**	1.4± 8.46	1.17 ± 4.41*
	%200	2.0 ±31.48*	2.1 ± 39.76**	2.8 ± 19.04**	1.4± 9.71	1.29 ±2.88*
72 ساعة	السيطرة	**1.8 ±54.01**	**2.1 ± 20.04**	**1.5 ± 12.18**	**1.7± 13.76**	**1.82 ± 7.48**
	%10	1.9 ± 52.6	1.6 ± 24.11	2.3 ± 15.17	1.9± 8.11*	1.35± 5.91*
	%25	1.7 ± 47.28*	1.6 ± 24.90	2.0 ± 15.74	1.3± 12.06	1.27± 5.79*
	%50	2.4 ± 42.19*	1.6 ± 29.37**	3.9 ± 17.93	1.1± 10.49	1.33±5.36*
	%100	1.2 ± 40.65*	2.0 ± 33.18**	2.1 ± 16.51	1.9 ± 9.65	1.23±4.11*
	%200	1.1 ± 30.81*	2.8 ± 46.39**	1.8 ± 17.63**	1.6± 5.16*	1.24± 1.59*

_ * = انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$

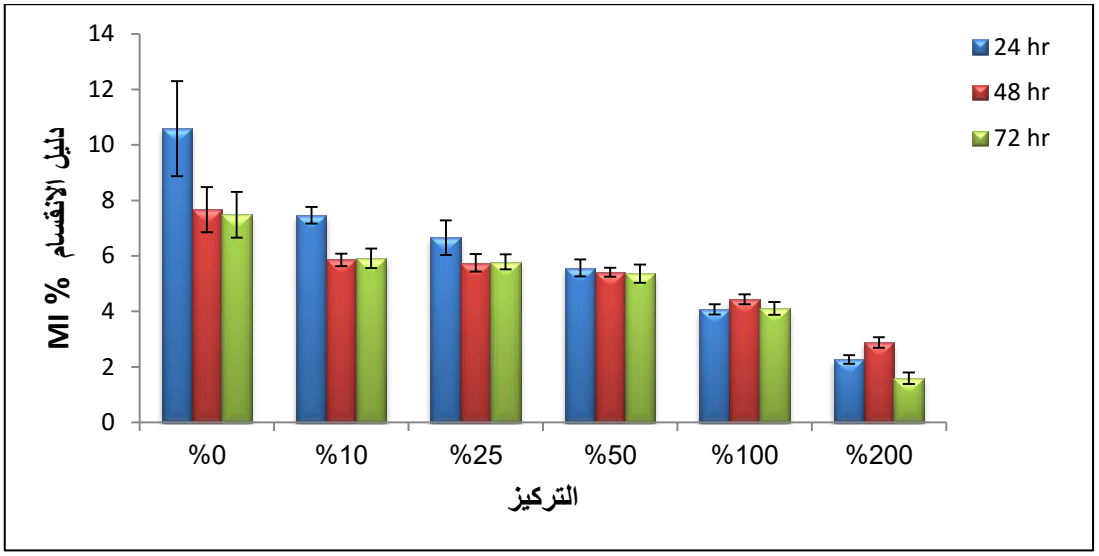
_ ** = ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$

جدول(4 -2) دليل أطوار الانقسام المايتوزي ودليل الانقسام (MI) لجذور نبات الـــــــبصل المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل

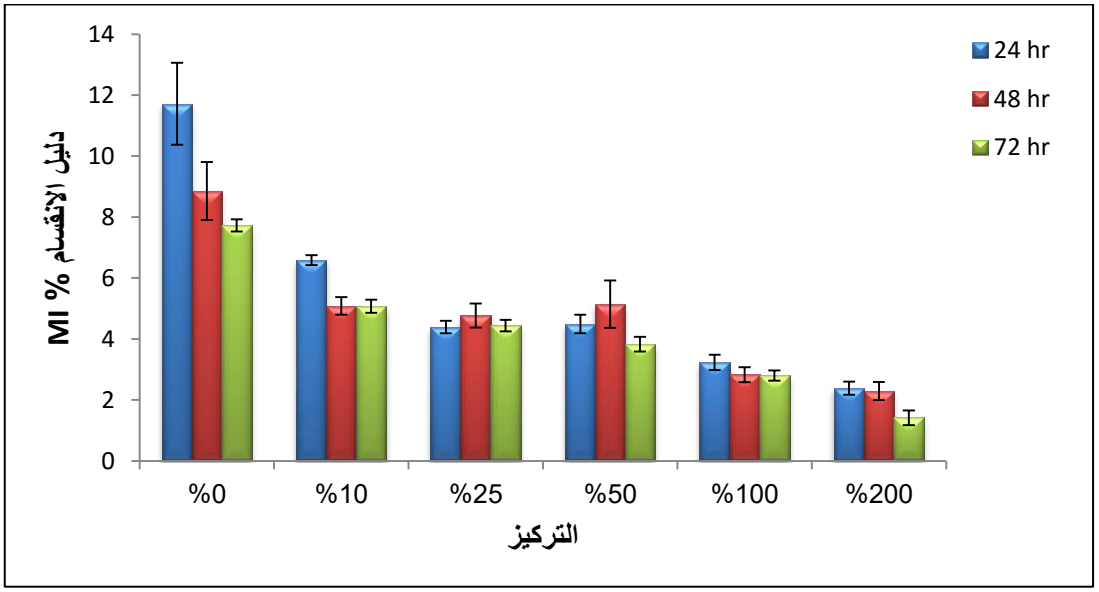
مدة تعريض	التركيز	دليل الأطوار% متوسط ± الخطأ القياسي				
		الطور التمهيدي Prophase	الطور الاستوائي Metaphase	الطور الانفصالي Anaphase	الطور النهائي Telophase	دليل الانقسام MI
24 ساعة	السيطرة	**3.1 ±56.25**	**1.01 ± 20.73**	**1.44 ± 13.3**	**1.1 ± 9.68**	**1.34 ± 11.71**
	%10	1.2± 51.85	2.3 ± 27.81**	4.1± 7.62	3.6± 12.7	1.16 ±6.59*
	%25	1.8 ±42.72*	1.2 ± 29.86**	3.9± 16.85	1.0 ± 10.57	1.20 ± 4.39*
	%50	1.7± 37.7*	2.0 ± 32.83**	1.7± 19.04**	1.1 ± 10.41	1.30 ± 4.49*
	%100	2.3 ± 34.37*	3.2 ± 37.57**	3.8 ± 16.96	4.1± 11.09	1.25 ± 3.23*
	%200	1.67± 31.01*	3.6± 42.27**	1.5± 17.10**	1.2± 9.61	1.21± 2.40*
48 ساعة	السيطرة	**4.9 ± 54.35**	**2.8 ± 21.71**	**1.7± 13.85**	**1.9 ± 10.06**	**1.95 ± 8.86**
	%10	2.8 ± 47.40	2.5± 29.84**	1.03± 13.69	1.6 ± 9.06	1.28±5.09*
	%25	3.5± 39.10*	2.9± 32.36**	2.6± 19.73	2.1 ± 8.80	1.39±4.81*
	%50	1.1± 33.37*	1.8± 35.31**	1.22± 21.28**	1.6 ± 10.03	1.77±4.56*
	%100	2.2± 31.57*	3.7± 41.34**	3.00± 18.17	2.6 ± 8.91	1.24±2.83*
	%200	2.5± 28.08*	1.8± 44.31**	1.0± 20.09**	1.3 ± 7.51*	1.18 ± 2.29*
72 ساعة	السيطرة	**2.9± 50.28**	**2.0± 21.52**	**1.9± 18.02**	**1.5± 10.17**	**1.20 ± 7.73**
	%10	1.2± 41.06	1.8± 32.06**	1.7± 16.32	1.9 ± 10.53	1.21±5.07*
	%25	2.6± 37.42*	1.5± 37.94**	2.1± 17.04	3.7±7.59	1.18±4.44*
	%50	1.6± 32.01*	2.7± 39.91**	3.3± 18.04	1.9± 10.03	1.24±3.83*
	%100	1.7± 29.20*	3.9± 45.32**	3.0± 16.34	1.5 ± 9.13	1.17±2.80*
	%200	1.8± 26.30*	2.29± 50.3**	1.0± 16.11	1.1± 7.25*	1.21±1.41*

_ * = انخفاض معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$

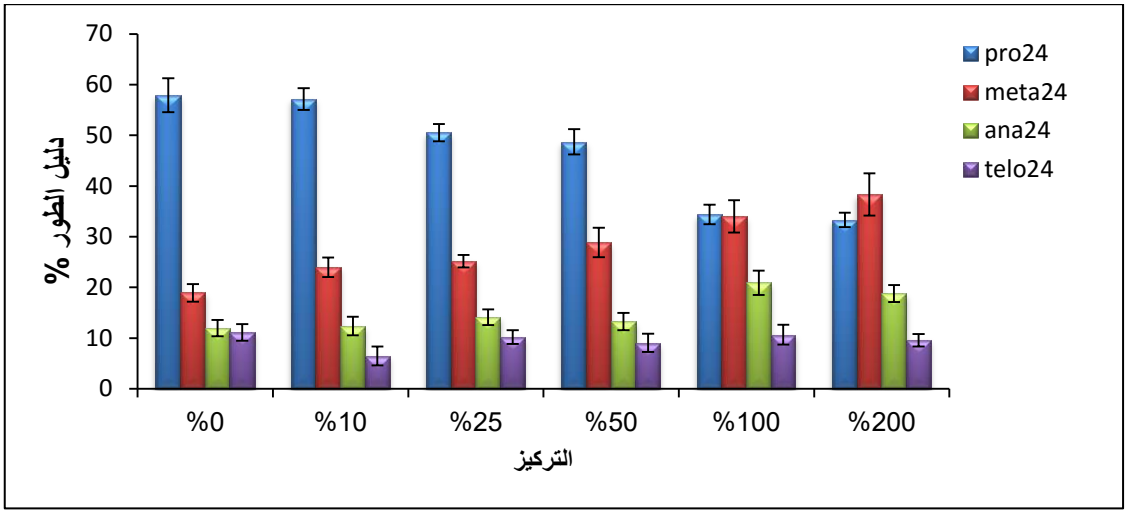
_ ** = ارتفاع معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$



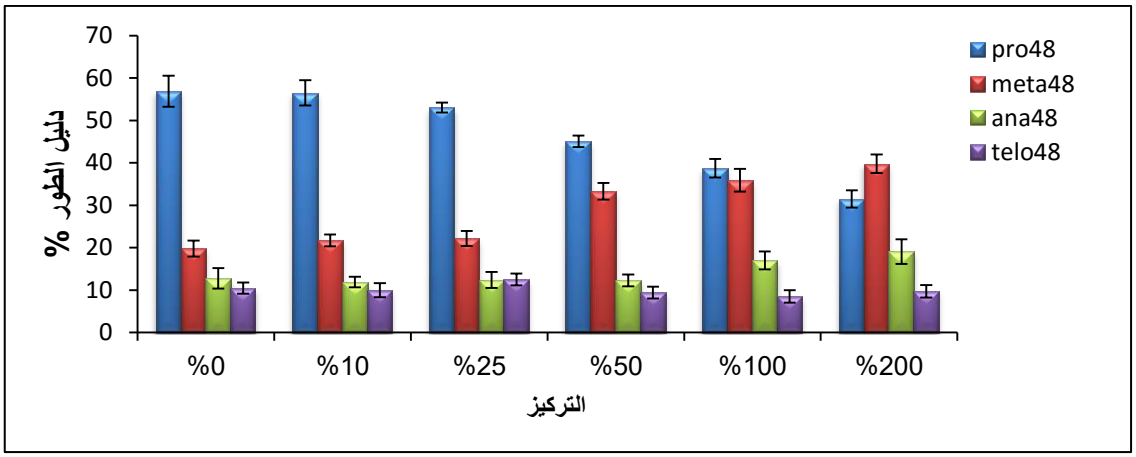
شكل (3) دليل انقسام MI في جذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل



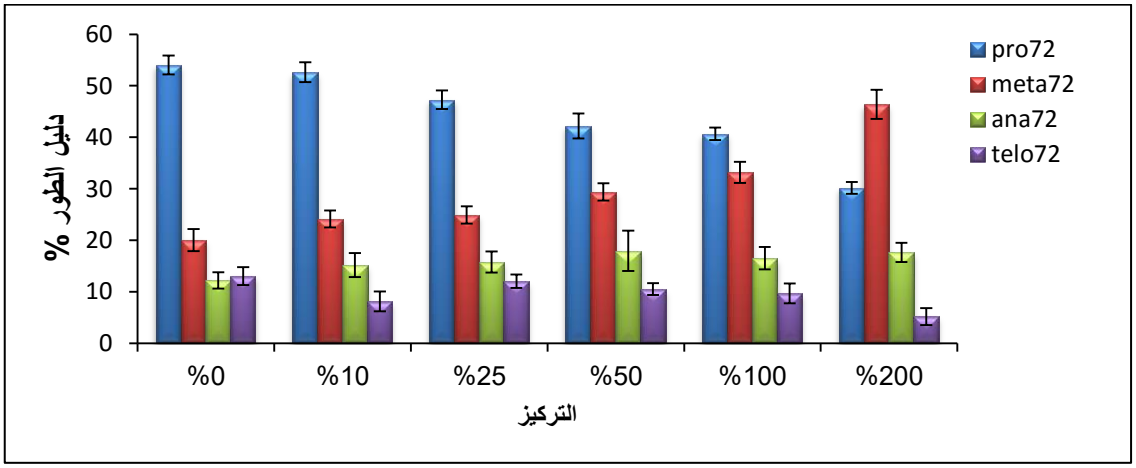
شكل (4) دليل انقسام MI في جذور نبات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل



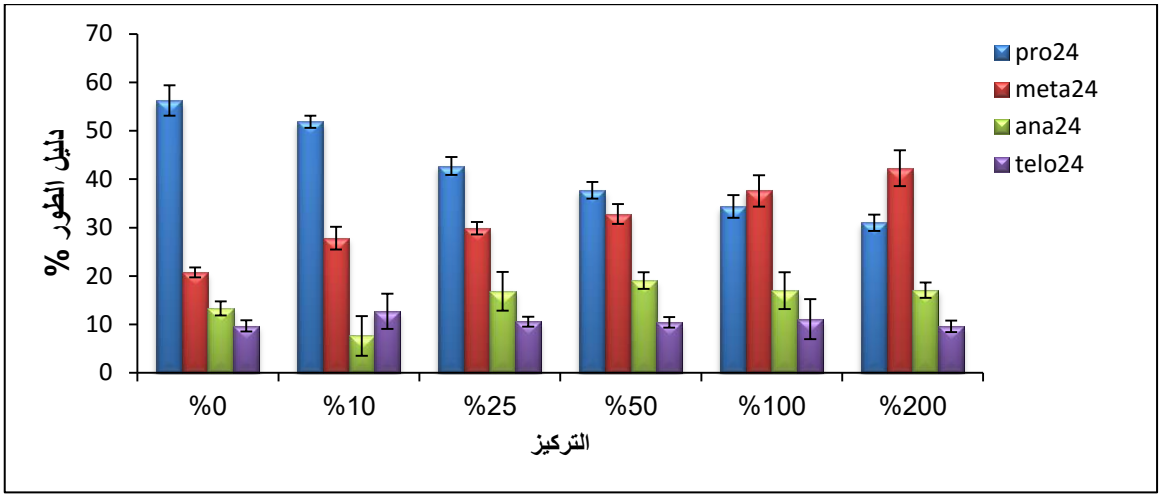
شكل(5) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 24 ساعة .



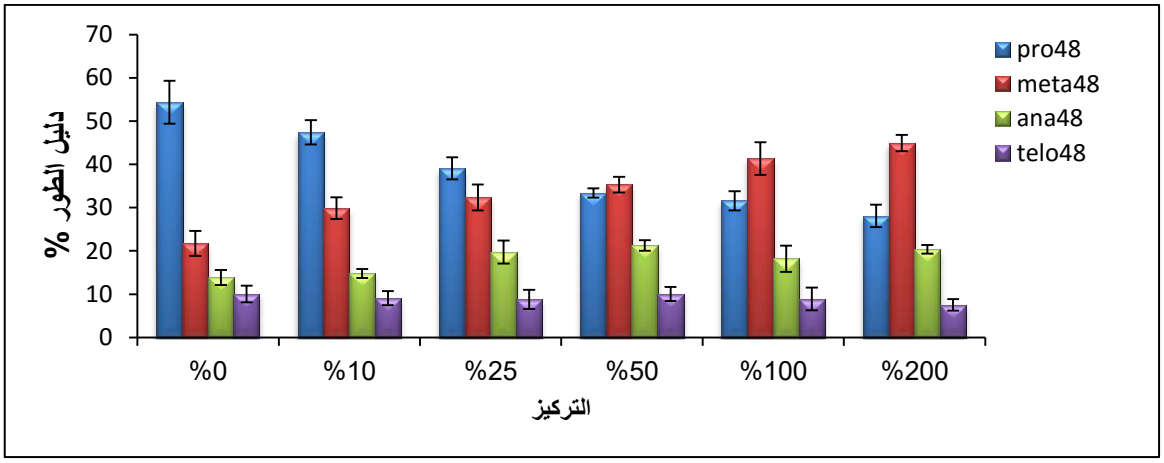
شكل (6) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 48 ساعة .



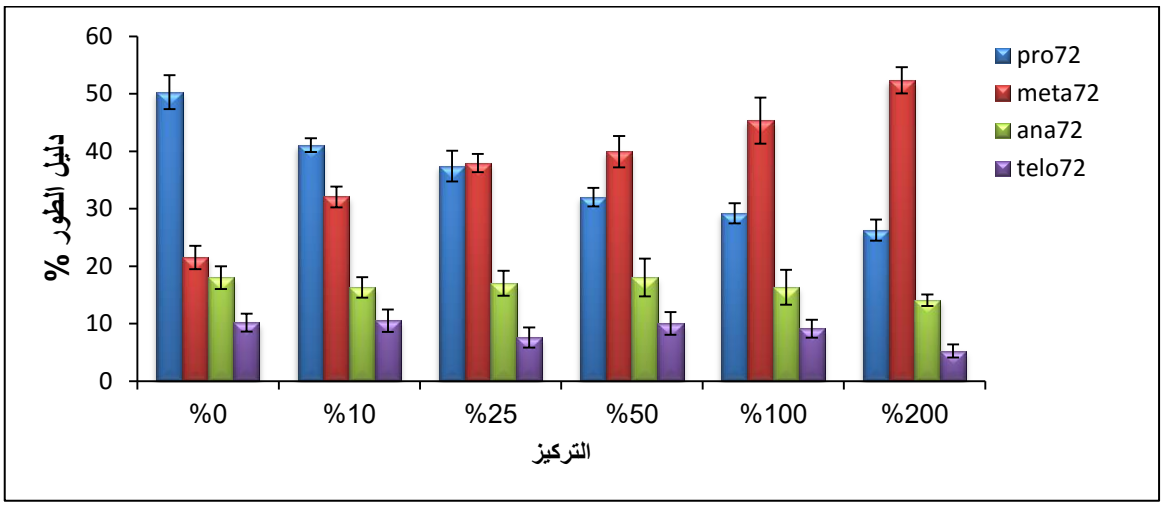
شكل (7) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 72 ساعة .



شكل (8) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 24 ساعة .



شكل(9) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 48 ساعة .



شكل (10) دليل الأطوار لخلايا نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بعد مدة تعريض 72 ساعة .

4-1-2-3- التشوهات الكروموسومية

يبين الجدول (4 -3) بان المستخلص المائي لبذور نبـــات الحرمل *P.harmala* L. أدى الى حدوث تشوهات كروموسومية عديدة في جذور نبات البصل المعرضة لجميع التراكيز المستعملة مـــــنه وعند جميع مدد التعريض 24،48، 72 ساعة ، وقد ازدادت نسبة التشوهات كلما زاد تركيز المستخلص،إذ كـــانت النسبة 13.24 عند التركيز 10% من المستخلص المائي بـــعد 24 ساعة تعريض وأصبحت 22.72، 51.7، 63.24، 54.84، عند التراكيز 25، 50، 100، 200% عـــــلى التوالي لمدة التعريض نفسها .وتبين كذلك بان نسبة التشوهات الكروموسومية تزداد في اغلب الأحيان مع زيادة مدة التعريض إذ كانت نسبة التشوهات عـــند التركيز 25% (22.75، 35.99، 41.42)عند مدة التعريض 24، 48، 72 ساعة على التوالي.

يبين الجدول (4 -4) بان المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل أدى إلى حدوث تشوهات عديدة في كروموسومات البصل ولجميع التراكيز المستعملة .وقـــــــــد ازدادت نسبة التشوهات كلما زاد تركيز المستخلص، فكانت النسبة 48.36 عند التركيز 25% (التركيز نصف المؤثر) بـــعد 24 ساعة تعريض وأصبحت 55.11، 68.51، 63.33 عند تراكيز المستخلص 50، 100، 200% على التوالي عند مدة التعريض نفسها .وقد لوحظ بان نسبة التشوهات الكروموسومية في جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل كانت أعلى مـــن نسبة التشوهات في الجذور المعاملة بالمستخلص المائي إذ كانت أعلى نسبة تشوهات في الجذور عند استعمال المستخلص الكحولي 87.32 بينما عند استعمال المستخلص المائي كانت 63.24 .

يتضح من النتائج بان تعريض جذور البصل إلى المســـــتخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل *P.harmala* L. أدت إلى أحداث أنواع عديدة مـــــن التشوهات الكروموسومية فقد لوحظت أربعة أنواع مـن التشوهات الأكثر تكرار وهي الكروموسومات اللزجة Stickiness وشـــــكل الكروموسوم الكولشسيني C-Mitosis وظـــــــــــــهور الجسورBridge ، والتشتت الكروموسومي Disturbed chromosome شكل (13) . وكان أكثر أنواع الشذوذ الكروموسومي تكرارا عند استعمال المستخلص المائي هي ظاهرة اللزوجة Stickiness إذ كان مجموع الخلايا التي ظهر فيها هذا النوع من التشوه الكروموسومي ولجميع مدد التعريض482 خلية يليه شكل الكروموسومات المشتت (330) خلية ثـــــم C-Mitosis (223) خلية وأخيرا الجسورBridge (200) خلية .إما الجذور المعرضة للمستخلص الكحولي فكان أكثر أنواع الشذوذ تكرارا هي الكروموسومات اللزجة (565) خلية يليه نوع الشذوذ تشتت Disturbed (306) خلية ثم يليه ظهور الجسورBridge فكانت (275) خـــلية وأخيرا C-Mitosis وكانت (154) خلية جدول (4-3) ،(4-4) .

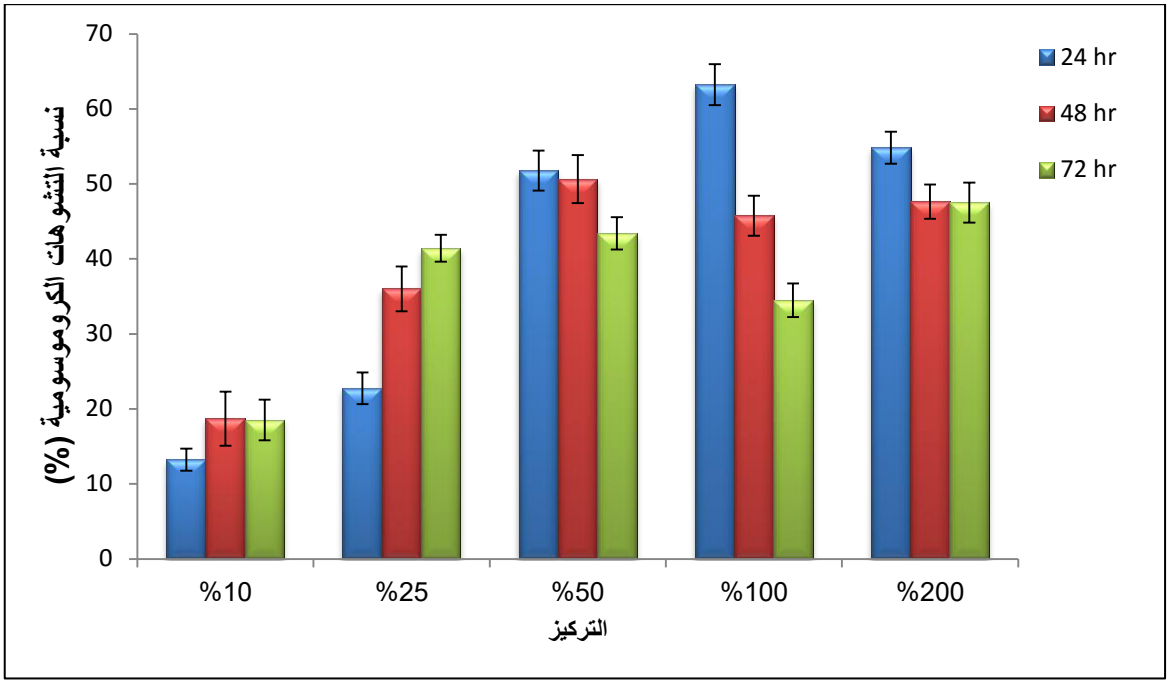
وجدت أنواع أخرى من التشوهات الكروموسومية في الجذور الـــــمعرضة لكلا المستخلصين المائي والكحولي ولكن بنسبة تكرار قليلة إذ كانت 84 خلية عند المستخلص المائي و 69 خلية عند المستخلص الكحولي مع كل مدة التعريض. وجدت الأنواع (القطب المنتقل Shifting of poles، انفصالي نجمي ، التعدد الكروموسومي ، الكروموسومات المتأخرة) شكل (13) وجدولين (4-3) ،(4-4) .

جدول (4 -3) النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية وأنواع التشوهات لجذور نبات البصل *A.cepa* المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نـــــبات الحرمل *P.harmala*

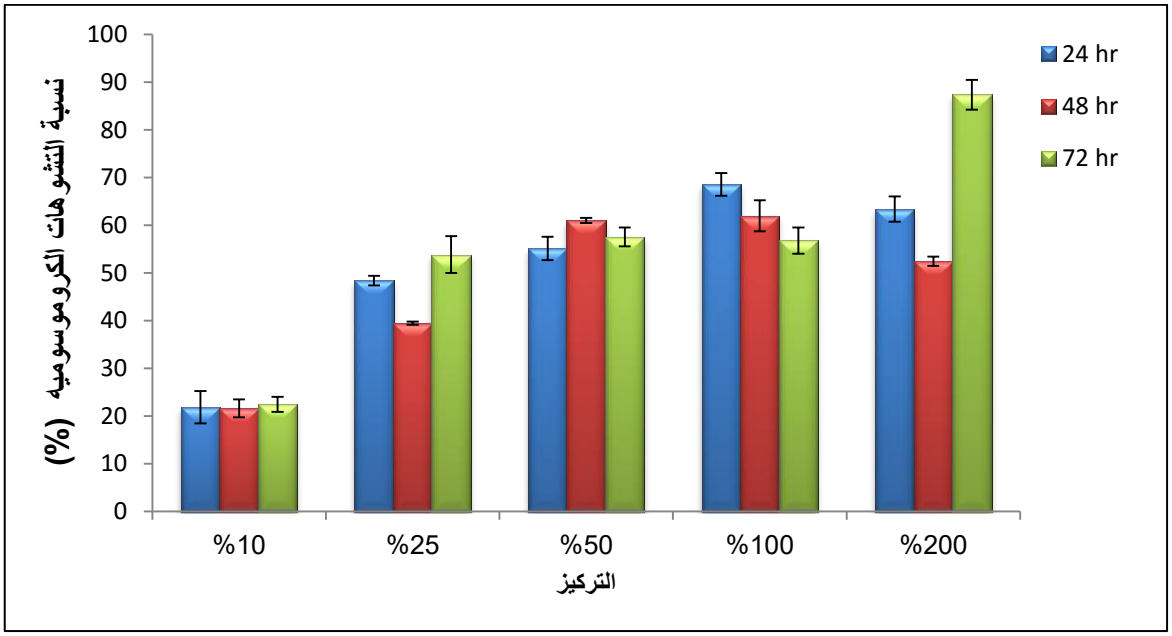
مدة التعريض	التركيز	التشوهات الكروموسومية					الخلايا المنقسمة	نسبة التشوهات الكلية % متوسط± الخطأ القياسي
		Bridges الجسور	c-mitosis الكولشسيني	Stickiness الزوجة	Disturbing التشتت	Other أخرى		
24 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	529	0.00±0.00
	%10	5	3	21	12	8	370	1.47±13.24*
	%25	11	10	25	20	9	334	2.10±22.75*
	%50	16	35	41	39	14	280	2.67±51.78*
	%100	20	20	45	34	10	204	2.72±63.24*
	%200	9	16	24	16	3	124	2.12±54.84*
48 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	383	0.00±0.00
	%10	8	5	23	16	3	294	3.60±18.70*
	%25	15	19	38	24	8	289	2.98±35.99*
	%50	23	30	50	27	7	272	3.20±50.36*
	%100	16	21	37	22	6	223	2.66±45.74*
	%200	8	11	28	20	3	147	2.28±47.62*
72 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	374	0.00±0.00
	%10	10	9	21	15	0	297	2.71±18.51*
	%25	21	24	33	29	4	268	1.80±41.42*
	%50	17	15	45	26	7	255	2.15±43.41*
	%100	16	5	31	17	2	206	2.24±34.47*
	%200	5	0	20	13	0	80	2.66±47.50*
المجموع		200	223	482	330	84		

جدول (4 -4) النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية وانواع التشوهات لجذور نبات البصل *A.cepa* المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نـبات الحرمل *P.harmala*

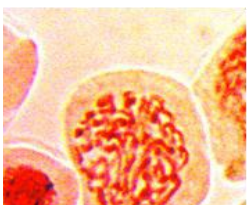
مدة التعريض	التركيز	التشوهات الكروموسومية					الخلايا المنقسمة	نسبة التشوهات الكلية % متوسط ± الخطأ القياسي
		Bridges الجسور	c-mitosis الكولشسيني	Stickiness الزوجة	Disturbing التشتت	Other أخرى		
24 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	585	00.00 ±00.00
	%10	15	9	27	16	5	330	3.40±21.82*
	%25	19	10	42	28	4	213	3.98±48.36 *
	%50	29	11	52	22	10	225	2.46 ± 55.11*
	%100	24	10	42	30	5	162	2.37±68.51*
	%200	10	11	31	20	4	120	2.64±63.33*
48 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	443	00.00 ± 00.00
	%10	14	0	26	15	0	255	1.85±21.57*
	%25	24	5	40	24	2	241	1.34±39.42*
	%50	25	19	60	30	5	228	1.54±60.96*
	%100	11	15	37	18	7	142	3.26±61.97*
	%200	9	12	30	17	8	145	3.96±52.41*
72 ساعة	السيطرة	0	0	0	0	0	387	00.00 ±00.00
	%10	17	3	23	13	1	254	1.58±22.44*
	%25	28	15	48	24	5	223	3.86±53.81*
	%50	22	14	47	19	9	193	2.00±57.51*
	%100	17	10	35	16	2	141	2.72±56.74*
	%200	11	10	25	14	2	71	3.13±87.32*
المجموع		275	154	565	306	69		



شكل (11) النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل



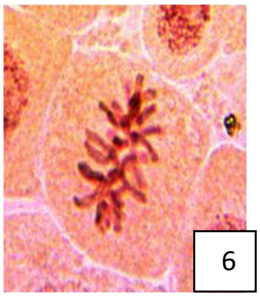
شكل (12) النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية لجذور نبات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل



1 2 3

4

5

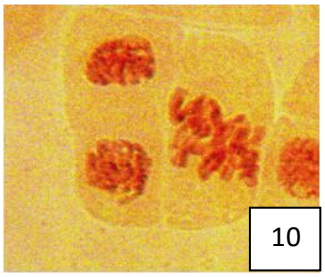


6

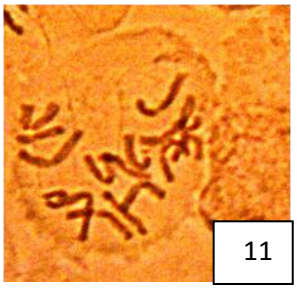
7

8

9



10



11

12

13

14

15

16

17

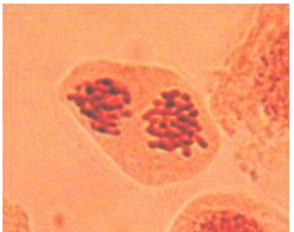
18

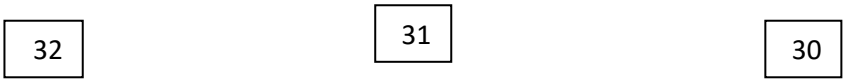
20

21

22

23





شكل (13) أنواع التشوهات الكروموسومية التي ظهرت في خلايا جذور نبات البصل المعرضة للمستخلص المائي والكحولي لبذور نبات الحرمل

1 = طور تمهيدي طبيعي-2،3،4،5 = طور تمهيدي مشتت - 6 = طور استوائي طبيعي-7= طور استوائي ملتصق

8= طور استوائي ملتصق وتأخر كروموسومي- 9 = تأخر كروموسومي-10= طور استوائي ونهائي ملتصق

11،12،13،14= طور استوائي الكولشسينيC-mitosis-15= طور انفصالي طبيعي- 16= طور انفصالي متشتت وجسر

17 = طور انفصالي متشتت وتأخر كروموسوم-18= جسور في طور الانفصالي - 19 = طور انفصالي متشتت

20= طور انفصالي متشتت و كروموسوم منفصل-21= جسر في طور الانفصالي- 22،23= طور انفصالي متشتت

24 = انفصالي متشتت اضطراب المغزل-25،26= طور انفصالي نجمي- 27= ازاحة الاقطاب Shifting of poles

28،29= تعدد كروموسومي Polyploidy - 30= طور نهائي طبيعي _ 31،32= طور نهائي ملتصق

4-1-3- الدراسة الجزيئية

4-1-3-1- تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA(RAPD)

تم الكشف عن السمية الوراثية لجذور نبات البصل المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* المائية والكحولية باستعمال تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA(RAPD) واستعملت عشر بادئات عشوائية Primers (OPA-1 OPA-2, OPA-3 ,OPA-4, OPA-5 ,OPA-6 , OPA-7 ,OPA-8, OPA-9 , OPA-10)

بينت نتائج التضاعف العشوائي ان البادئات الثلاثة (OPA-1, OPA-5 ,OPA-6) لم تجد مواقع متممة لتسلسلاتها على شريط الحامض النووي DNA القالب Template لذلك تم اهمالها .إما البادئ OPA-2 فكانت له مواقع متممة مع العينات المعاملة بالمستخلص المائي ولم يظهر اي حزم مع العينات المعرضة للمستخلص الكحولي ما عدا عينة واحدة لذلك تم اهماله في حساب قيمة GTS% وفي رسم الخارطة الوراثية أيضا الشكل (14) إما البوادئ الأخرى فقد أظهرت حزماً متعددة مع جميع العينات المدروسة.

أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي للعينات المعاملة بالمستخلصات المائية والكحولية اختلافا في عدد حزم الدنا DNA المتضاعفة وتباينا في أوزانها الجزيئية وذلك تبعا للبادئ المستعملة مقارنة بمعاملة السيطرة ، وظهرت هذه الاختلافات على شكل فقدان لبعض الحزم او اضافات لحزم جديدة ، وقد اهملت الحزم الخفيفة في تحليل النتائج إما التباين المعتمد على شدة التألق Intensity فلم يأخذ كمقياس للاختلاف الوراثي وذلك لان من الصعوبة يتم تحديد بدقة تركيز DNA لتداخل اكثر من عامل به.

بين الجدول (4-5) والأشكال(15، 16، 17،18،19،20) نتائج التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للمستخلص المائي لبذور الحرمل. وقد بينت النتائج بان البادئات ستة التي تم اختبارها أعطت 44 حزمة مع معاملة السيطرة وبالأوزان جزيئية تراوحت بين (90-1400) زوج قاعدة. أوضحت النتائج كذلك بان العينات المعاملة بالتركيز 10% من المستخلص المائي (اقل من التركيز نصف المؤثر) قد سجلت فقدان حزمتين بأوزان جزيئية (310،360) زوج قاعدة عند البادئ OPA-4، OPA-8 على التوالي،فضلا عن ظهور ثلاث حزم جديدة بالأوزان جزيئية (1400،1200،400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 . إما العينات المعرضة للتركيز 25% (اقل من التركيز نصف المؤثر) من المستخلص المائي لبذور الحرمل فلوحظ فقدان لحزمتين بالأوزان الجزيئية (310،360) زوج قاعدة مع البادئOPA-4 ،OPA-8 على التوالي، وإضافة ثلاث حزم بالا وزان الجزيئية(1400،1200،400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 وثلاث حزم أخرى بالأوزان الجزيئية (520 ،150 ،90) زوج قاعدة مع البادئ OPA-9.بينت نتائج التضاعف العشوائي لعينات البصل المعرضة لتركيز 50% (التركيز نصف المؤثر) فقدان حزمة واحدة عند الوزن الجزيئي (360) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 ،فضلا عن اضافة ثلاث حزم جديدة

بالأوزان الجزيئية (1400 ،1200 ،400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 ، ولوحظ اضافة ثلاث حزم أخرى بالأوزان الجزيئية(520 ،150 ،90) زوج قاعدة مع البادئ OPA-9 مقارنة بمعاملة السيطرة.

أظهرت التضاعفات العشوائية للعينات المعرضة للتركيز 100% من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل (التركيز الأعلى من EC_{50}) فقدان حزمة واحدة عند الوزن الجزيئي (360) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8، فضلا عن اضافة ثلاث حزم جديدة بالأوزان الجزيئية (1400،1200،400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 ، وكذلك اضافة ثلاث حزم جديدة بالأوزان الجزيئية(520 ،150 ،90) زوج قاعدة مع البادئ OPA-9. بين التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للتركيز 200% من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل فقدان حزمتين بالأوزان الجزيئية(450، 360) زوج قاعدة عند استعمال البادئ OPA-4، OPA-8 على التوالي ، فضلا عن اضافة ثلاث حزم جديدة بالأوزان الجزيئية (1400،1200،400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-8 ، وظهور ثلاث حزم جديدة أخرى بالأوزان الجزيئية (90,150,520) زوج قاعدة مع البادئ OPA-9 .

بين الجدول (4-6) والأشكال(15، 16، 17،18،19،20)نتائج التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل .بينت النتائج التضاعف العشوائي للعينات المعاملة بالتركيز 10% فقدان حزمة واحدة عند الوزن الجزيئي (350) زوج قاعدة مع البادئ OPA-9 ،فضلا عن اضافة خمس حزم جديدة اثنان منها مع البادئ OPA-4 وكانت بالأوزان الجزيئية (1200، 140) زوج قاعدة ،وثلاث حزم ظهرت مع البادئ OPA-8 بالأوزان الجزيئية (1400،1200،400) زوج قاعدة مقارنة بمعاملة السيطرة . بينت نتائج التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للتركيز 25% (التركيز نصف المؤثر) من المستخلص الكحولي ظهور اثنان من حزم جديدة بالأوزان الجزيئية (1200، 140) زوج قاعدة مع البادئ OPA-4 ، وثلاث حزم أخرى مع البادئ OPA-8 بالأوزان الجزيئية (1400،1200،400) زوج قاعدة ولوحظ فقدان حزمتين ذات الأوزان الجزيئية(450،350) زوج قاعدة عند البادئOPA-4 ، OPA-9 على التوالي مقارنه بمعاملة السيطرة. اما التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للتركيز 50% (التركيز الأعلى من التركيز نصف المؤثر) من المستخلص الكحولي لبذور الحرمل فنتج عنه فقدان لثلاث حزم بالأوزان الجزيئية(450، 400، 350) زوج قاعدة مع البادئ OPA-4,OPA-3,OPA-9 على التوالي، فضلا عن ظهور ثمان حزم جديدة ثلاثة منها مع البادئ OPA-3 بالأوزان الجزيئية (750، 370، 350) زوج قاعدة ، اضافت حزمتان جديدة بالأوزان الجزيئية (1200، 140) زوج قاعدة مع البادئ OPA-4، وسجلت أيضا ظهور ثلاث حزم مع البادئ OPA-8 بالأوزان الجزيئية(1400،1200،400)زوج قاعدة. بينت العينات المعرضة للتركيز 100% من المستخلص الكحولي لبذور الحرمل فقدان حزمتين بالأوزان الجزيئية (800، 400) زوج قاعدة مع البادئ OPA-3 ولم يلاحظ إي فقدان للبادئات الأخرى ، إما من ناحية الحزم الجديدة فقد لوحظ ظهور حزمتين بالأوزان الجزيئية(370، 350) زوج قاعدة مع البادئ

OPA-3 ،وسجل ظهور حزمة واحدة عند الوزن الجزيئي (1200) زوج قاعدة مـــع البادئ OPA-4 ، اما مع البادئ OPA-8 فـــقد ظهرت حزمتان بالأوزان الجزيئية(1200، 550) زوج قاعدة .وعـــند استعمال البادئ OPA-9 لوحظ ظهور حزمتين بالأوزان الجزيئية (150، 90) زوج قاعدة .بيـنت نتائج التضاعف العشوائي للعينات المعرضة للتركيز 200% من المستخلص الكحولي فقدان حزمتين بالأوزان الجزيئية(800، 400) زوج قاعدة مـع البادئ OPA-3 ، فضلا عـن اضافة حزمتان بالأوزان الجزيئية (370، 350) زوج قاعدة مـع البادئ نفسه ، إما مع البادئ OPA-4 فظهرت حزمة واحدة جديدة عـــند الوزن الجزيئي (1200) زوج قاعدة ، وظهرت حزمتان جديدة عنـد استعمال البادئ OPA-8 بالأوزان الجزيئية (1200، 550) زوج قاعدة ، إمـــــا عند استعمال البادئ OPA-9 فظهرت حزمتان بالأوزان الجزيئية (150، 90) زوج قاعدة.

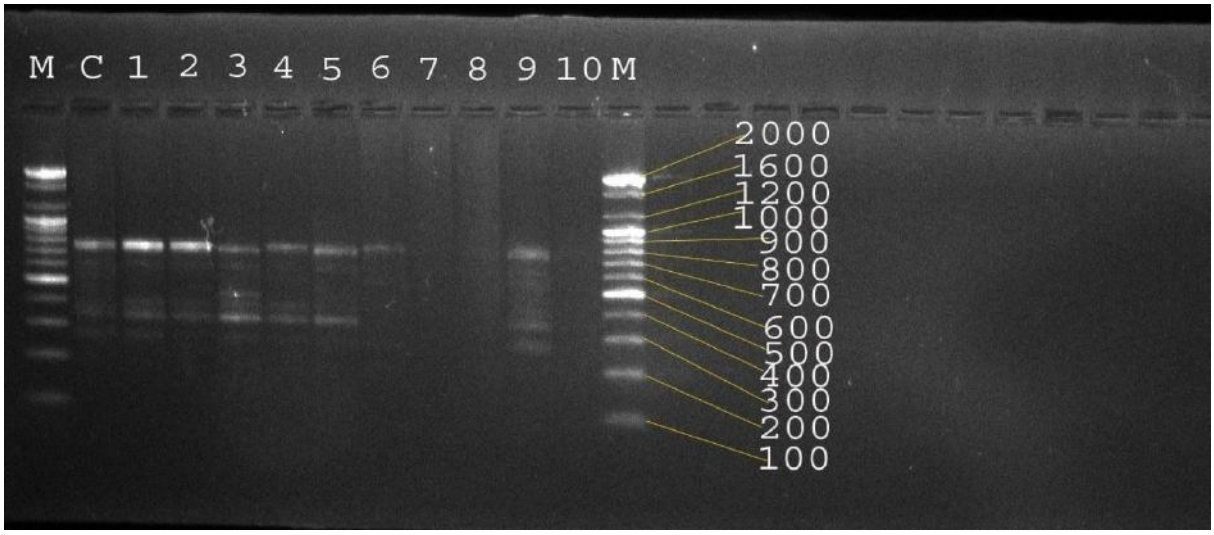
يتضح من نتائج التضاعف العشوائي لعينات البصل بان مستخلصات الحرمل المائية والكحولية ولجميع التراكيز المستعملة قد سببت طفرات نقطية عديدة وظهرت تلك الطفرات على شكل فقدان لحزمة أو أكثر أو اضافة لحزم جديدة ، ولوحظ كذلك بان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي كانت أكثر من مجموعها في العينات المعاملة بالمستخلص لذلك عد المستخلص الكحولي أكثر تأثيرا في دنا DNA جذور نبات البصل من المستخلص المائي ،اتضح من النتائج بان ظهور الحزم الجديدة كانـت أكثر من فقدان للحزم مقارنة بمعاملة السيطرة ومع اغلب البؤادئ المستعملة إذ كان مجموع عدد الحزم الجديدة التي ظهرت في العينات المعرضة للمستخلص المائي (27) حزمة وللمستخلص الكحولي (32) حزمة بينما كان مجموع عدد الحزم المفقودة للمستخلص المائي (8) حزم وللمستخلص الكحولي (11) حزمة أيضا.

جدول (4 -5) الحزم المكتسبة والمفقودة الناتجة من تقنية التـــضاعف العشوائي (RAPD) لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل.

البادئات Primers	الحزم الكلية في معاملة السيطرة bp	التراكيز									
		%10		%25		%50		%100		%200	
		حزم جديدة bp	اختفاء الحزم Bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp
OPA-3	800,700, 500,400, 290	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-4	1400,1000 ,700,600, 500,450, 310,300, 120	-	310	-	310	-	-	-	-	-	450
OPA-7	1400,1200 800,500, 400,360, 350,220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-8	900,650, 510,360, 350	1400 1200 400	360	1400 1200 400	360	1400 1200 400	360	1400 1200 400	360	1400 1200 400	360
OPA-9	1400,850, 750,600, 400,350, 290,190	-	-	520 150 90	-	520 150 90	-	520 150 90	-	520 150 90	-
OPA-10	1400,1100 800,500, 400,360, 330,300, 220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
المجموع	44	3	2	6	2	6	1	6	1	6	2

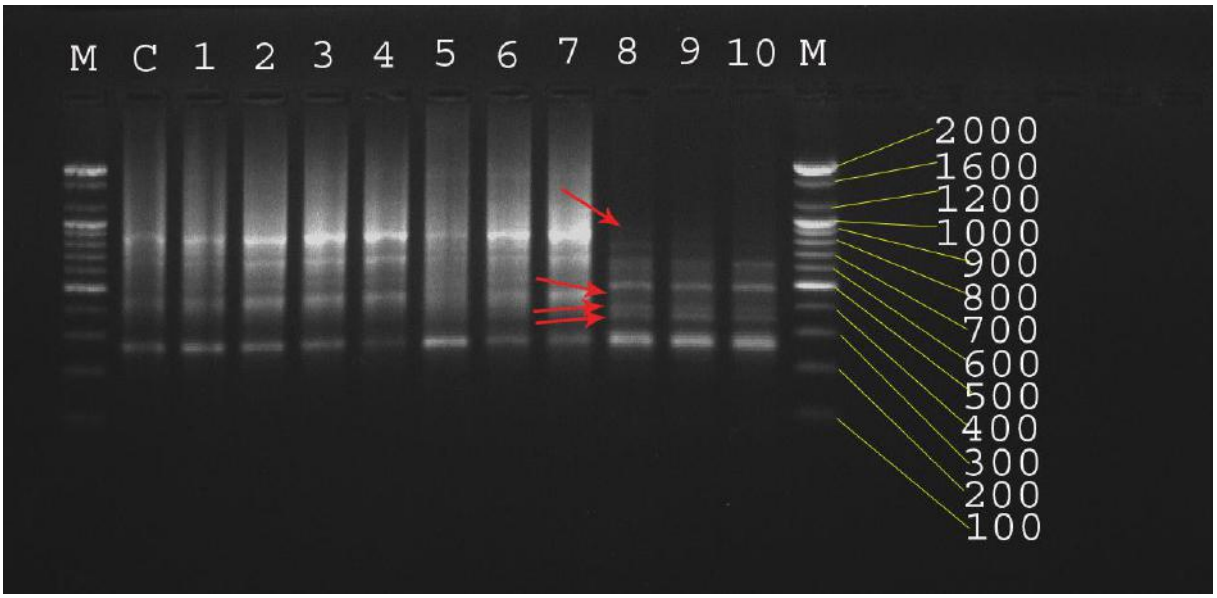
جدول (4 -6) الحزم المكتسبة والمفقودة الناتجة من تقنية التـــــضاعف العشوائي (RAPD) لعينات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل .

البادئات primers	الحزم الكلية في معاملة السيطرة bp	التراكيز									
		%10		%25		%50		%100		%200	
		حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp	حزم جديدة bp	اختفاء الحزم bp
OPA-3	800,700, 500,400, 290	-	-	-	-	750 370 350	400	370 350	800 400	370 350	800 400
OPA-4	1400,1000 ,700,600, 500,450, 310,300, 120	1200 140	450	1200 140	450	1200 140	450	1200	-	1200	-
OPA-7	1400,1100 800,500, 400,360, 350,220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-8	900,650, 510,360, 350	1400 1200 400	-	1400 1200 400	-	1400 1200 400	-	1200 550	-	1200 550	-
OPA-9	1400,850, 750,600, 400,350, 290,190	-	350	-	350	-	350	150 90	-	150 90	-
OPA-10	1400,1100 800,500, 400,360, 330,300, 220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
المجموع	44	5	2	5	2	8	3	7	2	7	2



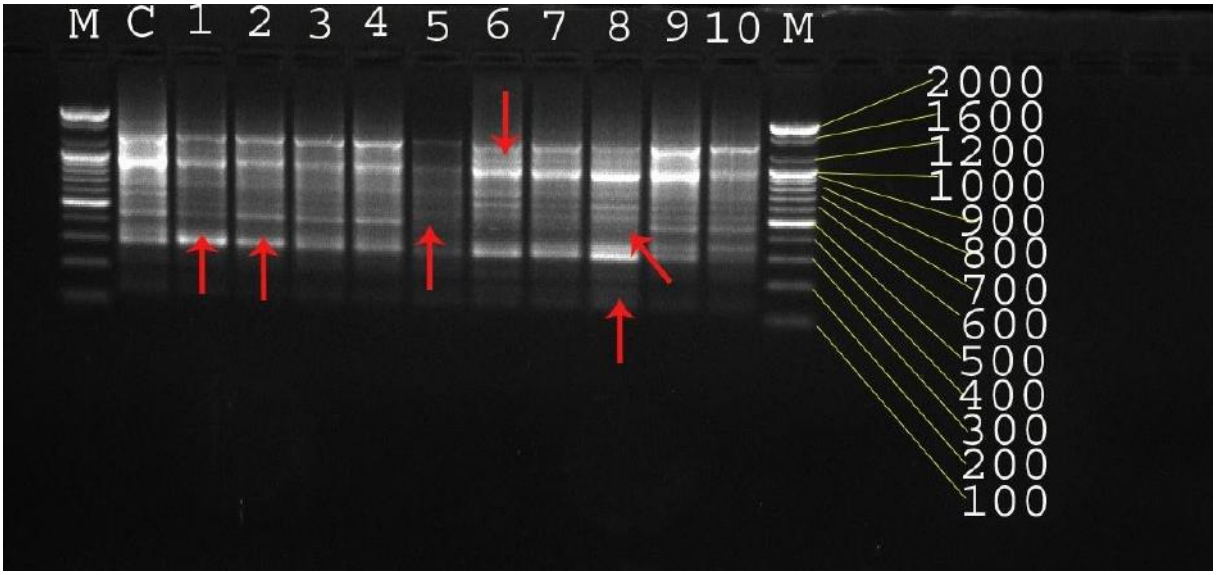
شكل (14) نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-2 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



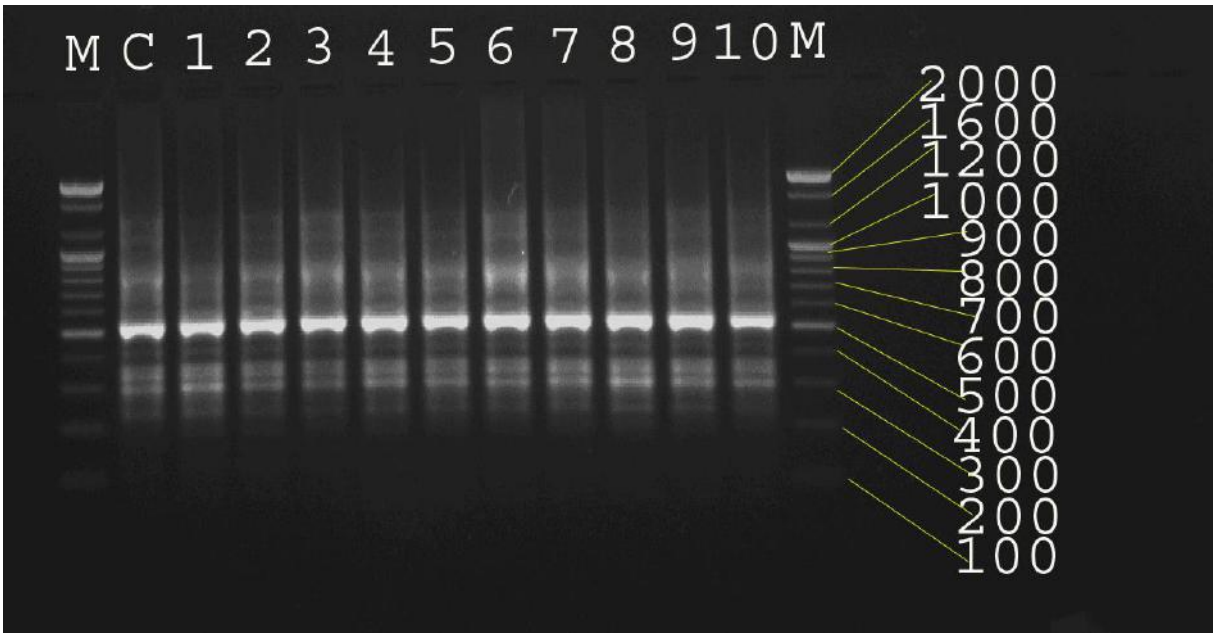
شكل (15)نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-3 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



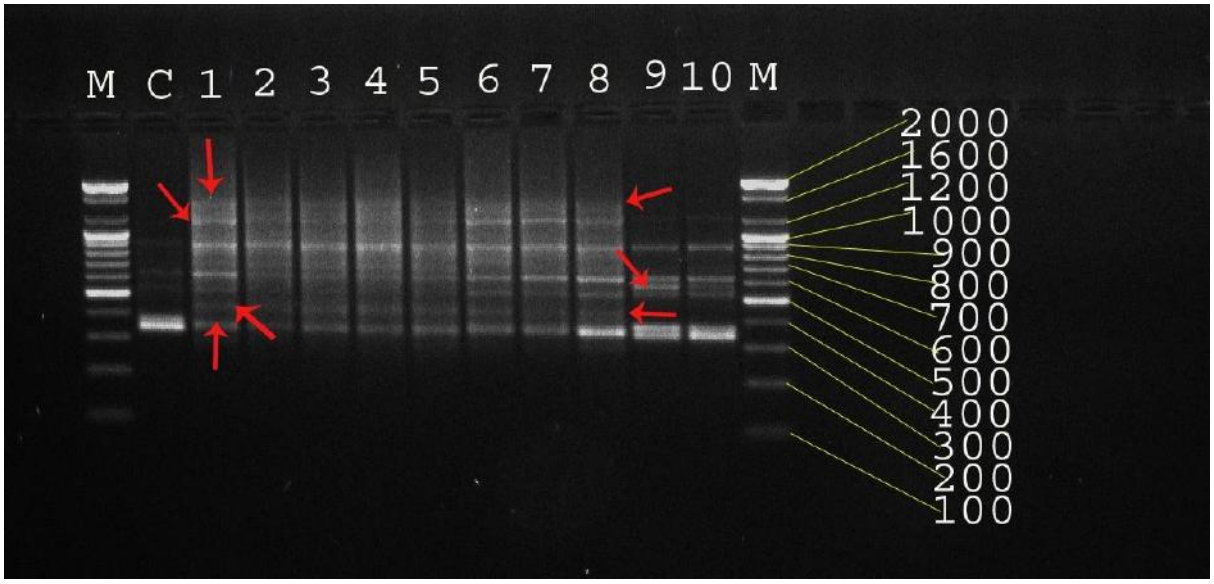
شكل (16)نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-4 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



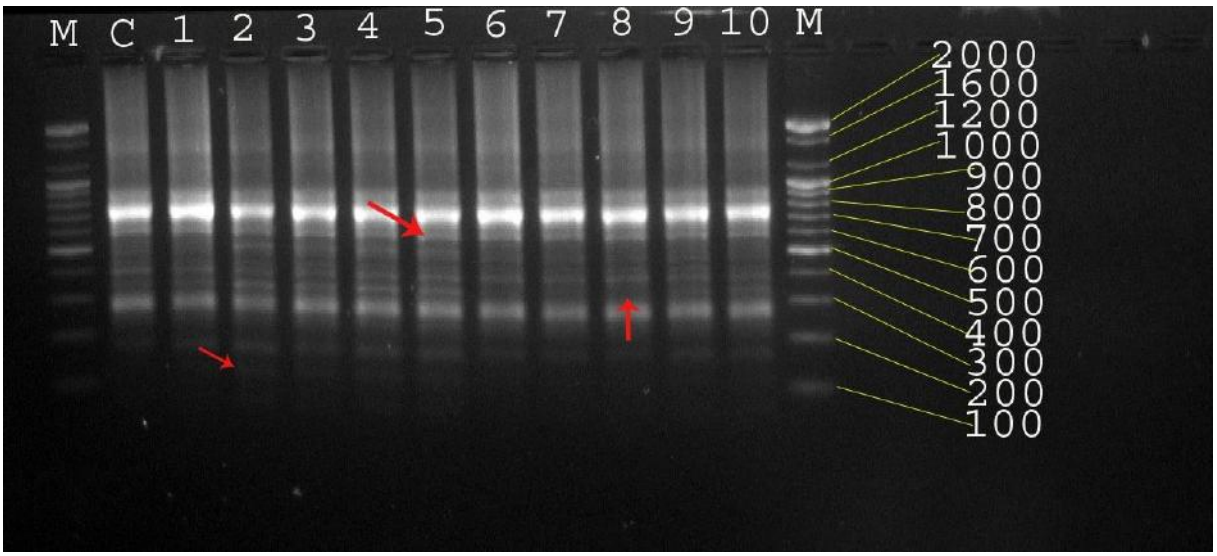
شكل (17)نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-7 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



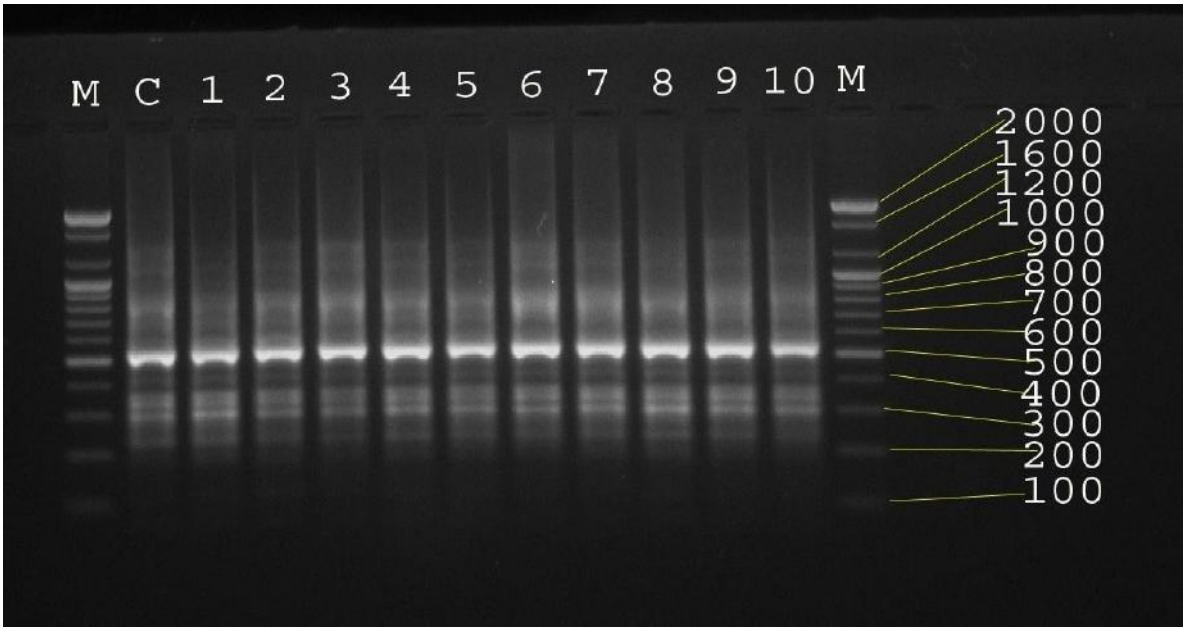
شكل (18) نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-8 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



شكل (19) نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-9 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .



شكل (20) نواتج التضاعف العشوائي مع البادئ OPA-10 على هلام الاكاروز1.5% لعينات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل مع الدليل الحجمي

M=الدليل الحجمي ،C= السيطرة،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100 %مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كـــــــــــــــحولي،8 = 50% كحولي، 9= 100% كحولي،10=200% كحولي .

4-1-3-2-نسبة الاستقرار الجينوم Genomic template stability (GTS%)

تم دراسة التغيرات في أنماط التضاعف العشوائي (RAPD) للعينات المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل *P.harmala* مقارنة بمعاملة السيطرة من خلال قياس نسبة الاستقرار الجينوم Genomic template stability (GTS%) ، وهو مقياس كمي يعكس التباينات التي تحصل بين أنماط التضاعف العشوائي(RAPD) للعينات المعرضة للملوثات المختلفة .يبين الجدول(4-7) قيمة GTS% لجذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل واتضح بان قيمة GTS % قد انخفضت في العينات المعاملة بالمستخلص مقارنة بمعاملة السيطرة، وسجل انخفاض عند التركيز10% إذ بلغ 81 .84 ، واستمر بانخفاض عند التركيز 25، 200 % إذ بلغ 78.56 لوحظ من الجدول بان قيمة GTS% قد انخفضت بشكل ملحوظ ابتداءً من تركيز 10% لذا يمكن عد مستخلص الحرمل المائي سام وراثيا ابتداءً من التركيز 10% حسب الدراسة الحالية.

جدول (4 -7) نسبة الاستقرار الجينوم GTS % لعينات جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي لبذور نبات الحرمل

البادئات Primers	عدد الحزم الكلية في معاملة السيطرة	التراكيز					
		%0	%10	%25	%50	%100	%200
		GTS	GTS	GTS	GTS	GTS	GTS
OPA-3	5	100	100	100	100	100	100
OPA-4	9	100	88.89	88.89	100	100	88.89
OPA-7	8	100	100	100	100	100	100
OPA-8	5	100	20	20	20	20	20
OPA-9	8	100	100	62.5	62.5	62.5	62.5
OPA-10	9	100	100	100	100	100	100
المعدل		100	84.81	78.56	80.42	80.42	78.56

بين الجدول(4-8) نسبة GTS% لجذور نبات البـــصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل.إذ انخفضت نسبة GTS % للعينات المعاملة بالمستخلص مقارنة بمعاملة السيطرة وسجلت انخفاض عند التركيز25,10% إذ بلغت 36 .82 فـي كلاهما، واستمر بانخفاض بالتركيز50 % وبلغ 69.03 .لوحظ مـــن الجدول بان قيمة GTS% قد انخفضت بشكل ملحوظ ابتداءً من تركيز 10% لذا يمكن عد مستخلص الحرمل الكحولي سامة وراثيا ابتداءً من التركيز 10%، وتبين أن المستخلص الكحولي أكثر سمية وراثية من المستخلص المائي وذلك لانخفاض قيمة GTS% إلى 69.03 بينما كان انخفاض لقيمة GTS% عند المستخلص المائي 78.56.

جدول (4 -8) نسبة الاستقرار الجينوم % GTS لعينات جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل

البادئات Primers	عدد الحزم الكلية في معاملة السيطرة	التراكيز					
		%0	%10	%25	%50	%100	%200
		GTS	GTS	GTS	GTS	GTS	GTS
OPA-3	5	100	100	100	20	20	20
OPA-4	9	100	66.67	66.67	66.67	88.89	88.89
OPA-7	8	100	100	100	100	100	100
OPA-8	5	100	40	40	40	60	60
OPA-9	8	100	87.5	87.5	87.5	75	75
OPA-10	9	100	100	100	100	100	100
المعدل		100	82.36	82.36	69.03	73.98	73.98

4-1-3-3- مخطط التحليل العنقودي لعينات البصل المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية

تم الحصول على شجرة القرابة الوراثية اعتمادا على النتائج التي تم التوصل اليها من استعمال البادئات العشوائية لتقانة الـ RAPD على عينات البصل المعرضة لمستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل *P.harmala* L. وكذلك على عينات السيطرة (ماء مقطر فقط) و باستعمال مقياس Jaccard للتشابه الوراثي .

يتضح من الشكل (22) بان العينات أدرجت ضمن التحليل العنقودي في مجموعتين رئيستين

المجموعة الرئيسة الأولى : وضمت تحت مجموعتين

تحت المجموعة الأولى : وضمت عينه السيطرة فقط

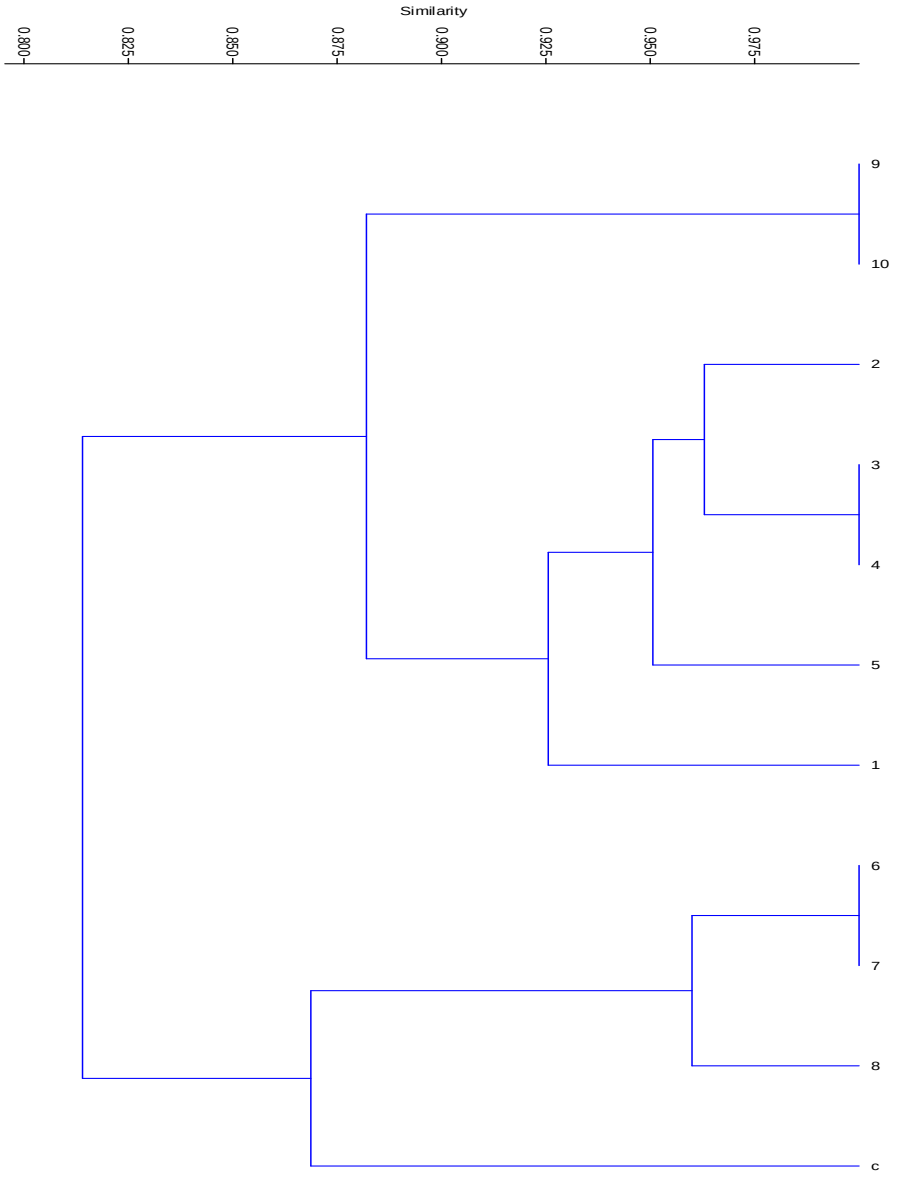
تحت المجموعة الثانية : وضمت عينات البصل المعرضة للمستخلص الكحولي بالتراكيز 10، 25، 50%

المجموعة الرئيسة الثانية: وضمت تحت مجموعتين

تحت المجموعة الأولى :وضمت جميع العينات المعرضة للمستخلص المائي

تحت المجموعة الثانية: وضمت عينات البصل المعرضة للتراكيز100،200% من المستخلص الكحولي.

يتضح بان نتائج RAPD وشجرة القرابة استطاعت من عزل عينات البـــصل المعرضة للمستخلص المائي عن تلك المعرضة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل فضلا عن انعزال عينة السيطرة في تحت مجموعة منفصلة عن العينات الأخرى مما يؤكد قابلية المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل في احداث أضرار (طفرات) في دنا جذور نبات البصل.



الشكل (21) الشجرة الوراثية لعينات البصل المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل .

C= السيطرة ،1= 10%مائي ،2 = 25% مائي ، 3 = 50% مـــــائي ،4 = 100% مائي ،5= 200% مائي ،6 = 10% كحولي ،7= 25% كحولي،8 = 50% كحولي ،9 = 100% كحولي ، 10=200% كحولي .

4-2- المناقشة

4-2-1- تأثير مستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* في متوسط طول جذور نبات البصل

تم استعمال اختبار البصل *Allium cepa* test (ACT) لغرض تحديد التأثيرات السمية للمستخلصات المائية والكحولية لبذور نبات الحرمل وذلك كون هذا الاختبار يستعمل بشكل واسع لغرض تقييم السمية الخلوية والوراثية للعديد من المستخلصات النباتية منها نبات الكساف Cassava والصبار والليمون (Obrunfemi *et al*.,2011;Ilbas *et al* ,2012;Eren&Ozata, 2014). وكذلك لتقييم السمية الوراثية للعديد من الملوثات البيئية المختلفة كالمعادن الثقيلة (Taspinar *et al*.,2009) والمبيدات المختلفة (Thais *et al*.,2007) والأسمدة الكيميائية (Ailemys *et al*.,2013).أن وجود تأثير لهذه الملوثات في النظام النباتي يشير إلى وجود مخاطر مباشرة Direct أو غير مباشرة Indirect في الكائنات الحية.

يعد الجذر أكثر الأجزاء النباتية حساسية للظروف البيئية وذلك لأنه في تماس مباشر مع المحيط وان تأثير المادة السامة يمكن ملاحظتها مباشرة من خلال نمو طول الجذر (Fiskesjo,1993)، إذ أوضح (Assaeed & Al-Doss,1996; Shao *et al*.,2013) ان مستخلص بذور الحرمل أدت الى تثبيط نمو المجموع الجذري لبعض النباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين أكثر من تثبيطها للمجموع الخضري.أوضحت نتائج البحث الحالي أن مستخلصات بذور الحرمل قد خفضت معنويا متوسط طول جذور نبات البصل وكان انخفاض طول الجذر أعلى كلما زادت تراكيز المستخلصات شكل (1) ، قد يعود سببه الى بعض المواد الكيميائية التي وجدت في بذور الحرمل (Allelochemicals) كالقلويدات Alkaloids والكلايكوسيدات Glycoside والتانينات Tannins (Movafeghi *et al*., 2009; Buhkari *et al*.,2008)، اوضح (Xuan *et al*.,2004) المواد الكيمائية المستخلصة من بعض النباتات الطبية (Allelochemicals) تؤثر بشكل معنوي في عملية نمو وتطور النظم النباتية المتعرضة لها، إذ أنها تؤثر بشكل مباشر في الضغط الانتفاخي للخلية Cell turgor (El-Khawas&Shehala, 2005) وعلى الانقسام الخلوي وعملية بناء الحامض النووي DNA (Roshchina, 2001) ومن ثم تؤدي إلى تثبيط نمو الخلية و تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج (Farajollahi *et al*.,2012)الذي وجد بان المركبات الكيمائية الموجودة في مستخلصات بذور الحرمل كان لها تأثيرا سلبيا في أنبات بذور نبات الشعير المتدلي *Bromus tectorum* ، لاحظ كذلك بان نسبة تثبيط أنبات بذور نبات *B.tectorum* قد تأثرت معنويا بزيادة تراكيز بذور الحرمل.

بينت النتائج كذلك بان التركيز نصف المؤثر كان 50% للمستخلص المائي و 25% للمستخلص الكحولي، أي ان المستخلص الكحولي كان تأثيره ضعف تأثير المستخلص المائي في نمو جذور نبات البصل وقد يعود السبب في ذلك كون المحلول المذيب الايثانول Ethanol يعد مذيبا جيدا وأفضل من الماء في اذابة القلويدات التي تمثل المادة المؤثرة في نمو وانقسام خلايا جذور نبات البصل وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Fenandes *et al*,.2007; Hoshina,2002;Hu *et al*.,1997)

4-2-2- تأثير مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية في نشاط الانقسام المايتوزي

اعتمد اختبار دليل الانقسام MI الذي يمثل عدد الخلايا المنقسمة في مراحل الانقسامية المختلفة الى عدد الكلي للخلايا ، في تقييم السمية الوراثية للعديد من الملوثات البيئية الكيمائية ،الفيزيائية ، البايولوجية فضلا عن النباتات الطبية (Panda & Sahu,1985; Smaka-kincl*etal*.,1996; Sharma *et al*.,2012; Hassan &Yassein,2014).

أشار (Sharma ,1983)بان انخفاض دليل الانقسام MI إلى 50% او دون ذلك فانه يعد ذات تأثير شبه مميت Sub lethal effect وتدعى هذه النسبة حد السمية الخلوية (Cytotoxic threshold) ،إما (Antonsie –wiez,1990) فأكد ان انخفاض دليل الانقسام الخلوي MI للعينات المعاملة بالملوثات إلى 22% او دون ذلك من معاملة السيطرة فانه يسبب تأثيرات مميتة Lethal effect للكائن الحي.

بينت نتائج الدراسة الحالية بان مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية أدت الى خفض دليل الانقسام MI معنويا وقد زاد التأثير كلما زاد تركيز المستخلص جدول (2،1) . وتتفق هذه النتائج مع دراسة سابقة على مستخلص أوراق نبات الحرمل (Baestin *et al*.,2009) وكذلك مع (Abo-El-khier & Abo-El-khier,1992) الذين أكدو على ان زيادة مادة Harmal القلوية المستخلصة من بذور الحرمل من 20 - 40 ملغم/مل أدت الى خفض دليل الانقسام في بذور نبات البصل بشكل معنوي. واتفقت هذه النتيجة مع دراسات أخرى للديد من المستخلصات النباتية كنبات لبلاب الحقول *Convolulus arvensis* (السعدي ،2008) ونبات المعدنوس *Petroselinum crispun* (Abd-Alwahab,2010).

أوضحت النتائج أن التراكيز (100,25%) من المستخلص المائي والكحولي على التوالي أدت الى تثبيط دليل الانقسام 50% من معاملة السيطرة لذلك عدت هذه التراكيز شبه مميتة وان التركيز 200% من كلا المستخلصين ثبط دليل الانقسام تقريبا 22% من معاملة السيطرة لذا عد تركيزا مميتا للمستخلصين (Sharma ,1983; Antonsie –wiez,1990).واعتمادا على هذه النتيجة يتضح بان المستخلص الكحولي كان تاثيره اعلى في دليل الانقسام لجذور نبات البصل من المستخلص المائي وقد

يرجع ذلك الى نوعية المذيب (الكحول الاثيلي) الذي يعمل على اذابه القلويدات بـــشكل أفضل من الماء ولاسيما مادة Harmaline الذي بدوره يثبط دليل الانقسام في جذور نبـــــــــــات البصل (Mekki,2014; Moura *et al*.,2007;Mateuca *et al*.,2006;Hu *et al*.,1997)

أن انخفاض دليل الانقسام في العينات المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل يدل على أن المستخلصات أحدثت اضطرابا في دورة الخلية ولذا قللت في عدد الخلايا الداخلة في الانقسام الخلوي تتفق هذه النتيجة مـع (Abdelrahman,1997;Abdelrahman,1998) الذين بينوا بان المستخلصات المائية والكحولية لبعض النباتات الطبية ومن ضمنها الحرمل تثبط دليل الانقسام من خلال تأثيرها في دورة الخلية أو على أية مرحلة مـن مراحلها او قد يعود السبب الى تثبيط عملية تخليق الحامض النووي DNA مما يؤدي الى احتجاز الخلية في مرحلة النمو الثانية G2 من دورة الخلية ولاسيما عند التراكيز العالية من المستخلصات (Kabarity & Mallalah,1980;El-Ghamery *et al*.,2000; Sudhakar *et al*.,2001) أو قد يطيل مدة طور البناء S-phase او قـــد يسبب تلفا او ضعفا في هذا الطور(Saggoo *et al*.,1991; Marko *et al*.,2001). كـما فسر (Mercykutty & Stephen ,1980) سبب تثبيط دليل الانقسام الى المركبات الكيمائية التي يحتويها المستخلص التي تعمل على تثبيط تخليق البروتينات التي تشارك في الانقسام الخلوي ، او مـــــــــسلك تـكوين البروتينات بـــــــــــــــشكل عام (Schneidermen *et al*.,1997; Hoessel *et al*.,1999 ; Turkglu,2007)

أدى استعمال مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية الى اضطراب فـــي عملية الانقسام الخلوي وتغير معنوي في دليل الأطوار مقارنة بمعاملة السيطرة ، لوحظ انخفاض مـــعنوي لدليل الطور التمهيدي ابتداءً من التركيز 25% للعينات المعرضة للمستخلصات مقارنة بـــمعاملة السيطرة وقد يعود السبب بان مستخلص بذور الحرمل قد أثرت في العمليات الحيوية الكيمائية التي تحدث في الخلية في الطور البيني التي تعيق الخلية مـــــــــــــــن الدخول إلى الطور التمهيدي (Williams & Omoh,1996). وأشار(Silva *et al*.,2011) بان القلويدات تؤثر بـــشكل كبير في بناء البروتين والدناDNA والتي تمثل العمليات الأساسية التي تحدث فـــي الطور البيني مما يؤثر في دخول الخلية إلى مرحلة الانقسام الخلوي والدخول للطور التمهيدي .

بينت النتائج ارتفاعا معنويا في دليل الطور الاستوائي مقارنة بمعاملة السيطرة ابتداءً مـــــن التركيز 50% للمستخلص المائي ولجميع التراكيز للمستخلص الكحولي .ان الزيادة فـــــــــي عدد خلايا الطور الاستوائي أو ما يدعى (Metaphase poisoning) يكون على حساب الخلايا التي في الأطوار الأخرى إذ تبقى الخلايا في الطور الاستوائي ولذا يتأخر انتقالها الى الـــــــــــــــــــــطور الانفصالي (Prasad & Das ,1977) يتضح من هذه النتيجة ان مستخلصات الحرمل قـــد تحتوي على مكونات

تؤثر في بناء النبيبات الدقيقة Microtubules التي تعد المكون الرئيس لألياف المغزل التي لها دور كبير في سحب الكروموسومات المصطفة عـــلى خط استواء المغزل وان أي تأثير على تكوين أو بناء خيوط المغزل يؤدي الى بقاء الخلايا عـــــــــــــند هذا الطور (Parsons&Williams,2000; Ye *et al*.,1998). او قد يكون التأثير فـي آليات الانقسام النووي ولذا يكـــــون تأثيره في تكوين وتوزيع خـيوط المغزل وإيقاف الانقسام الخلوي (Irena,2005) . تتفق هذه النتيجة مع دراسة سابقة عن نبات الحرمل (العبيدي،2004) ومع (السعدي ،2013) الذي درس تأثير المستخلص الخام لجذور نبات الفجل في القمم النامية لجذور نبات البصل.

لوحظ ارتفاع معنوي لدليل الطور الانفصالي في الجذور المعرضة للتراكيز العالية مـــن المستخلص المائي والكحولي وهذا يتفق مع (Kabarity & Mallalah ,1980) الذي بيـــن ان التراكيز العالية من المستخلصات تعمل على احتجاز الخلية عند طور واحد أو أكثر من أطوار الانقسام الخلوي وعدم وصول الخلية الى الطور اللاحق، وقد انخفض بشكل معنوي دليل الطور النهائي عـند بعض التراكيز ولاسيما التراكيز العالية من المستخلص المائي والكحولي والتي قد تكون بسبب تراكم الخلايا فـي الطور الاستوائي وصعوبة انتقالها للأطوار اللاحقة (Reib,1975 ; Ravindran,1971).

التشوهات الكروموسومية

التشوهات الكروموسومية هي عبارة عن تغيرات في تركيب الكروموسوم ناتجة عـــن تكسر او تبادل المواد الكروموسومية وهذا يؤدي الى ظهور انواع متعددة مـــن التشوهات (Fiskesjo,1997). اختبار التشوهات الكروموسوميه فعال في الكشف عـــن السمية الوراثية والخلوية للعديد من الملوثات الكيميائية واعتمد من قبل العديد من الدراسات (Shehab,1979; Carita-Marin-Morales,2008).

أدى استعمال المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل الى احداث العديد مـــــــــن التشوهات الكروموسومية عند جميع التراكيز المستعملة ولكل مدة تعريض وقـــــــد ازدادت نسبة التشوهات في جذور البصل كلما زاد تركيز المستخلص ومدة التعريض وهـــذه العلاقة توضح سمية مستخلصات بذور الحرمل ، تتفق هذه النتيجة مـع العديد من الدراسات (Smaka-kincl*et al* .,1996 ; Patlolla *et al* .,2012 ; Sharma &Vig , 2012 ; Karaismailoylu,2013)

ظهرت العديد من التشوهات عـــند استعمال مستخلصات بذور الحرمل وكان التشوه الكروموسومي الأكثر تكرارا هي لزوجة الكروموسومات Sticky chromosomes وهـــــذا يتفق مـــــــــع (Badr& Elkington,1982 ; Patil& Bhat,1992 ; Nwakanma*et al*.,2009; Nwakanma& Okoli,2010) وقد يـــــعود سببها الى التصاق البروتينات المكونة للكروموسومات

بشكل فيزيائي Physical adhesion(Patil&Bhat 1992) او بسبب حصول اضطرابات في عملية ايض الحامض النووي للخلايا المعاملة اوقد يكون بسبب تحلـل البروتينات المرتبطة بالدنا DNA داخل الكروموسومات (Mercykutty& Stephen ,1980) ، كـــــــــما اكد الباحثون (El-Ghamery *et al*.,2000 ;Tipirdamaz *et al*.,2003;Turkoglu,2007) على ان الكروموسومات اللزجة تعد سببا رئيسا في موت الخلية وذلك كونها حالة شذوذ غير معكوسة (Irreversible).

ظهرت نسبة عالية من الكروموسومات المتشتتة Disturbed chromosomesعنـــــــد طوري التمهيدي والاستوائي وقد يعود سبب حدوث هذا النوع مـن التشوه الى فقدان نشاط فـعالية النبيبات الدقيقة Microtubules التي يتألف منها ألياف المغزل مـما يؤدي الى تثبيط تكوين جهاز المغزل بشكل طبيعي مما يعمل على عدم انتظام في انتقال الكروموسوم نـحو الأقطاب التي تمثل الحالة الطبيعية بل تـــــوجد الكروموسومات بشكل مبعثر في الخلايا المنقسمة (El-Khodary*et al*.,1990).

إما حالة التشوه من نوع الكولشسيني C-mitosis قد يعود سبب ظهورها لفشل انتقال الكروموسومات الى قطبي الخلية (Kuras *et al*.,2006) او تثبيط تصنيع البروتين خلال الانقسام واحتمال يعود سببها الى منـــــــــــــــــــع ازاله حلزنة DNA اللازمة لاستنساخ mRNA الخاص ببروتين المغزل (Mercykutty& Stephen ,1980). عملية نشوء المغزل تعتمد على توازن اللزوجة Viscosity balance ما بين السايتوبلازم والمغزل واي تغيير في لزوجة السايتوبلازم سيؤدي الى اعاقة ميكانيكية المغزل وتبقى الكروموسومات حرة وغير مرتبطة بأية قوة في الخلية (Sharma & Sharma,1980) .

إما ظهور الجسور الكروموسومية Bridge في خلايا جذور نبات البصل المعاملة بالمستخلص المائي والكحولي لبذور الحرمل وقد يعود سببها فـــشل عملية الانفصال الكامل بين الكروماتيدات المتلاصقة عند ابتعادهما في الطور الانفصالي التي عادة تتكون بين الكروماتيدات الشقيقة التي تبقى معا حتى الطور الانفصالي المتأخر او الطور النهائي .وإذ كانت هـــذه الاتصالات قوية جدا فمن الممكن ان تؤدي الى حدوث كسر الكروماتيدات المتصلة في مناطق الاتصال أو بالقرب منها عند الطور الانـــفصالي (Gomurgen,2005 ; Turkoglu,2008)، إما (Shaheb,1980a; Shehab&Adam,1983) فقد بينوا بان الجسور الكروموسوميه قـد يكون سببها حدوث كسور في الكروموسوم وإعادة الارتباط . ذكرت(Fawzia *et al*.,2012) ان ظهور الكروموسومات اللزجة بشكل كبير في مرحلة الطور الاستوائي قد تودي الى زيادة ظهور الجسور الكروموسوميه فـــي المراحل اللاحقة اي الطور الانفصالي والنهائي ومن ثم يؤدي الي اعاقة الانقسام الخلوي.ان ظهور اكثر من جسر كروموسومي دليل على السمية العالية للمستخلص شكل (13) وقـد يعود السبب لحدوث كسور في الكروموسوم والكروماتيد (Young &Young,1993).

الكروموسومات المتأخرة Lagging chromosome وهي إحدى أنواع التشوهات التي ظهرت ولكن بأعداد قليلة، وظـــــهر هذا الشذوذ في الطورين الاستوائي والانفصالي وقـــــــد يعود سببها الى فشل الكروموسومات من الارتباط مــع ألياف المغزل وانتقالها الى قطبي الخلية (Turkoglu, 2007)،او قد يكون سببها أعاقة لحركة الكروموسومات في الطور الاستوائي المبكر(Nagpal&Grover,1994) وقد عـــــــد هذا التشوه اقل سميه من أنواع التشوهات الأخرى وذلك لامكانية رجـوعه إلى الحاله الطبيعية Reversible (Fiskesjo,1993; Fiskesjo,1985). ظهرت حالة التعدد الكروموسوميPolyploidy عند استعمال مستخلصات الحرمل وقد يـــــــــــعود سبب ظهورها الى تثبيط كامل لآلية تكوين المغزل (Minija *et al*.,1999).ظهرت حـالة القطب المنتقل Shifting of poles في الطور الانفصالي عـند تعريض جذور نبات البصل للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل وهي حالة شذوذ حادة قد تنشا نتيجة ازالة البلمرة Deploymeaziation في خيوط المغزل (Mederios& Takahashi,1987)او قد تنشا نتيجة مسار غير منتظم لخيوط المغزل او الى نـشاط غـــــــــــير منتظم للمغزل (Ford & Correl,1992 ; Waters & Salmon ,1997). وقد ظهر هذا النوع من الشذوذ عـــــــند دراسة التأثير السمي لمادتي Baking Powder & Monosodium Glutamate فـــــــــــــــــــــي جذور نبات البصل (Renjana *et al*.,2013).

بينت النتائج بان نسبة التشوهات الكروموسومية عـــــــند المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل كانت أعلى من نسبتها عند المعاملة بالمستخلص المائي إذ كانت أعلى نسبة تشوهات عنـــــد المستخلص الكحولي 87.32 بينما عند المستخلص المائي كانت 63.24 وقـــد يرجع ذلك الى ان الكحول الاثيلي يعمل على اذابه القلويدات بـشكل أفضل مـن الماء ولاسيما مادتي Harmaline,harmine التي بدورها تســــــــــــــــــبب زيادة ملحوظة بنسبة التشوهات الكروموسوميه (Hu *et al*.,1997; Abo-El-khier& Abo-El-khier,1992).

4-2-3- تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال لسلسلة DNA(RAPD)

تم تقييم السمية الوراثية لمستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية عـلى مستوى الدنا DNA وباستعمال نبات البصل كنظام بايولوجي بتقانة التضاعف المتعدد الاشكال لسلسلة DNA . استعملت تقانة التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال في الكشف عــن السمية الوراثية للعديد من الملوثات البيئية (Savva,1996 ;Savaa,1998) وذلك لانها تنتج عددا مـــــــــن الحزم ذات الوضوح العالي (Ellsworth *et al.*,1993) كما تعد طريقة ناجحة لفحص عدد كبير من عينات الدنا في وقت قصير، فضلا عن أنها لا تحتاج الى معرفة مسبقة لتسلسل الحامض النووي DNA و انها فعالة حتى مع العينات ذات النقاوة غير العالية (Reiter *etal.*,1992). هـذه المزايا ادت الى استعمالها بـــشكل واسع من قبل العديد من الباحثين لتقييم السمية الوراثية للعديد مـــن المواد الكيمائية والملوثات البيئية المخـــــــــتلفة ولمخـــــــتلف الكائنات (Singh*et al.*,1990; Nandi *et al.*,1998;Grayson *et al.*,1999; Atierzar *et al.*,2002; Dewolf *et al.*,2004; Mburu & Hanotte,2005).

تم استعمال 10 بادئات 6 منها فقط أعطت حزما واضحة لجميع العينات المدروسة ،إذ أعطت حزما بأوزان جزيئية تراوحت بين (90 -1400) زوج قاعدة ، وكان عدد الحزم الكلية 44 حزمة مع معاملة السيطرة. اوضحت النتائج وجود اختلاف واضح في عدد من الحزم والأوزان الجزيئية إذ كان المجموع الكلي للحزم المكتسبة التي ظهرت في العينات المعرضة للمستخلص المائي (27) حزمة وللمستخلص الكحولي (32) حزمة ، اما عدد الحزم المفقودة فكان مجموعها في العينات المعرضة للمستخلص المائي (8) حـــــزم وللمستخلص الكحولي (11) حزمة مقارنة بمعاملة السيطرة .

يتضح من هذه النتائج بان مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية سببت تغيرات في جينوم جذور نبات البصل اي أدت الى حدوث طفرات ، ظهرت على شكل حزم مفقودة او مكتسبة بسبب السمية العالية لهذه المستخلصات ،إذ عد نبات الحرمل مـــن أسوأ الأعشاب الموجودة في الغرب (CIPM,2009) لوحظ من النتائج ان مجموع الحزم الجديدة كان اعلى مـن مجموع الحزم المفقودة في العينات المعرضة للمستخلصات مع جميع البادئات . يعتقد ان ظهور حزم جديدة قد يكون سببه حدوث تغيرات كبيرة في الدنا نبات البصل بسبب تعرضها للمستخلصات التي قد تؤدي الى زيادة فـــي قدرة البادئ لإيجاد متمماته فـي قالب DNA (Atienzar *et al.*,1999)، او قد يكون بســـــبب تضاعف بعض المواقع في جينوم البصل بـــعد المعاملة بالمستخلصات (Atienzar *et al.*,2002) او بســـــبب الطفرات Mutations (Atienzar & Jha ,2006).

ذكر (Atienzar *et al*.,1999) ان الاتـــــحادات المتماثلة Homologousre combination اذ يحدث ارتباط سلسلتين متتمة لسلاسل البادئ قد يكون سببا لظهور حزمة جديدة (Nandi *et al*.,1998; Qari,2010) اكد (Atienzar *et al*.,1999) ان اختلاف انماط RAPD يكون عادة نتيجة لتغير بسيط (قاعدة واحدة) او قـــد يكون نتيجة لتغير كروموسومي معقد) . بينت النتائج كذلك ان مجموع عدد الحزم المفقودة (11) حزمة في العينات المعرضة للمستخلص الكحولي و (8) حزم في العينات المعرضة للمستخلص المائي مقارنة بمعـاملة السيطرة وقد يعود سبب فقدان الحزم بالدرجة الأساس الى عملية إعادة الترتيب للقواعد النايتروجينة في الجينوم بسبب المعاملة او قد يكون بدرجة اقل بسبب الطفرات النقطية Point mutations التي يحدثها المستخلص (Enan,2006 ; Liu *et al*.,2009).

أوضحت نتائج الدراسة ان تقانة بصمة DNA fingerprinting ومـــنها طريقة RAPD مفيدة فـــــي تقييم التباين الوراثي الـــــــــــــناتج بسبب الطفرات المستحدثة و وهذه النتيجة تتفق مـــــع (Kumar *et al*.,2011) والذي توصل الى النتيجة نفـــــــــــــــسها وذلك باستعماله تقنية Inter-simple sequence repeat (ISSR) ومع (Mekki *et al*.,2015) اذ استـــــعملت طريقة Simple sequence repeat (SSR) ، واستعملت طريقة RAPD لتقييم السمية الوراثية للعديد من الملوثات العضوية وغير العضوية (Labra *et al*.,2003) وتعد تقنية فعالة في المقارنة السريعة بيـــن العينات الملوثة وغير الملوثة (Liu *et al*.,2005) .

نسبة الاستقرار الجيني GTS% مقياس نوعي يعكس التباينات التي تحصل فـــــي أنماط التضاعف العشوائي RAPD للعينات المعرضة للملوثات المختلفة ومنها المستخلصات النباتية إذ استعمل GTS% للكشف عن السمية الوراثية لمختلف الجينات وانه يـــعكس كفاءة نظامي الاصلاح والتكرار للدنا DNA Repair and replication ان ارتفاع قيمة GTS فـــــي العينات تعني بان الجينوم اقل عرضة للتغير وان نظام الاصلاح الدنا كفوء فـــي هذه الأفراد إما انخفاض قيمة GTS فتـــــــــعني بان هناك احتمال للضرر في الدنا DNA وان نظام الاصلاح في هذه الأفراد اقل كفاءة (Suparna & Kundu,2015).

بينت الدراسة بان قيمة GTS قد انخفضت ابتداءً من التركيز 10% لكلا المســــــــــتخلصين المائي والكحولي واستمرت القيمة بالانخفاض كلما زاد تركيز المستخلص موضـــحا وجود اضرار للدنا مع زيادة تراكيز المستخلصات وبالنتيجة فقدان لنظامي الاصلاح والتكرار للدنا المتضرر. بـــينت النتائج كذلك بان قيمة GTS للمستخلص الكحولي قد انخفضت بشكل اكبر مـــن قيمتها في المستخلص المائي اذ كان اكبر انخفاض 78.56% عـند التركيز 200,25% للمستخلص المائي بينما كان اكبر انخفاض 69.03% عند التركيز 50% للمستخلص الكحولي وهذا يوضح ان المستخلص الكحولي كان أكثر سمية من المستخلص المائي وقد يعود السبب الى ان الكحول الاثيلي يعمل على اذابة القلويدات بشكل أفضل مـــــــــن الماء

(Hu *et al*.,1997;Abo-El-khier& Abo-El-khier,1992) والذي قـــد يعود له السبب فـي تلف مادة الدنا DNA.

تم رسم التحليل العنقودي المعتمد على نتائج التضاعف العشوائي RAPD وباستعمال معامل Jaccard للتشابه الوراثي وذلك لتقدير مستوى التباين الوراثي بين عينة السيطرة والعينات المعرضة لمستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية ، اذ أوضح (Lynch,1990) بان التحليل العنقودي المعتمد على نتائج RAPD من أكثر الطرائق فعالية في ايجاد العلاقة الوراثية او البعد الوراثي بين العينات المختلفة .

أوضحت النتائج شكل (21) بان عينة السيطرة قد انفردت في تحت مجموعة منعزلة عن العينات الأخرى المعاملة بالمستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل ،وهذه النتيجة تؤكد بوضوح التأثير السمي لجميع التراكيز المستعملة من المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل في دنا DNA جذور نبات البصل وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الباحثون (Mekki *et al* .,2015) عند دراسة التأثير السمي لمستخلصات بذور الحرمل المائي والكحولي في دنا DNA نبات الباقلاء عند استعمال طريقة SSR.

أوضحت النتائج كذلك انعزال العينات المعاملة بالمستخلص المائي عن تلك المعاملة بالمستخلص الكحولي وذلك يوضح اختلاف تأثير كلا المستخلصين في دنا جذور نبات البصل ، اذ أوضحت نتائج RAPD بان المستخلص الكحولي كان أكثر سمية وراثية من المستخلص المائي وظهر ذلك من خلال عدد الحزم المفقودة والمكتسبة في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي مقارنة بالعينات المعاملة بالمستخلص المائي. وتتفق هذه النتيجة مع نتائج التحليل الخلوي التي أكدت بان المستخلص الكحولي لبذور الحرمل كان أكثر تأثيرا في دليل الانقسام وفي نسبة التشوهات الكروموسومية لجذور البصل مقارنة بالمستخلص المائي.

الاستنتاجات

و

التوصيات

CONCLUSION AND RECOMMENDATION

الاستنتاجات

1 – أدت مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية إلى تثبيط معنوي في نمو جذور نبات البصل وقد ازداد تثبيط النمو بزيادة تراكيز المستخلصات ، وكان التركيز نصف المؤثر للمستخلص المائي في نمو جذور البصل 50% أما بالنسبة للمستخلص الكحولي فكان 25% لذا عد المستخلص الكحولي أكثر تأثيرا في نمو جذور نبات البصل من المستخلص المائي.

2 - أدت مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية إلى خفض دليل الانقسام MI في خلايا جذور البصل و زاد انخفاض دليل الانقسام بزيادة تراكيز المستخلصات ولكنه لم يتأثر معنويا بزيادة مدة التعريض.

3 - عُد التركيز 100% ، 25% من المستخلص المائي والكحولي على التوالي شبه مميت وذلك لأنه خفض معامل الانقسام إلى 50% مقارنة بمعاملة السيطرة ، وعد التركيز 200% لكلا المستخلصين مميتا لأنه خفض معامل الانقسام إلى 22% من معاملة السيطرة.

4 - سببت مستخلصات بذور الحرمل المائية والكحولية انخفاضا معنويا في دليل الطور التمهيدي وارتفاعا معنويا في دليل الطور الاستوائي .

5 - أحدثت مستخلصات بذور الحرمل العديد من التشوهات الكروموسومية وزادت نسبتها مع زيادة تراكيز المستخلصات ومدة التعريض وكانت أكثر أنواع التشوهات تكرارا (الكروموسومات اللزجة Stickiness ، تشتت الكروموسومي Disturbed،الطور الاستوائي الكولشسيني C-mitosis ، الجسور الكروموسوميه Bridge) فضلا عن أنواع من التشوهات ظهرت بنسب قليلة (القطب المنتقل Shifting of poles ، التعدد الكروموسومي Polyploidy، الانفصالي النجمي Star anaphase و الكروموسومات المتأخرة Lagging chromosomes).

6 – بينت نتائج التضاعف العشوائي المتعدد الاشكال للدناDNA (RAPD) اختلافا في عدد والأوزان الجزيئية لبعض حزم الدنا DNA في العينات المعاملة مقارنة بمعاملة السيطرة وقد كان مجموع الحزم المفقودة والمكتسبة في العينات المعاملة بالمستخلص الكحولي أكثر من المستخلص المائي مما يدل على أن المستخلص الكحولي أكثر سمية وراثية من المستخلص المائي فضلا عن ارتفاع عدد الحزم المكتسبة عن الحزم المفقودة في العينات المعاملة .

7- انخفضت نسبة الاستقرار الجيني %GTS في العينات المعاملة بالمستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل وازدادت بالانخفاض مع زيادة تراكيز المستخلصات.

8- بينت شجرة القرابة الوراثية المعتمدة على نتائج RAPD انعزال العينات المعاملة بالمستخلص المائي عن تلك المعاملة بالمستخلص الكحولي فضلا عن انعزال عينة السيطرة في مجموعة منفردة مـــما يؤكد حدوث أضرار كبيرة على دنا DNA العينات المعرضة للمستخلصات.

التوصيات

1- توصي الدراسة الحالية بعدم استعمال مستخلصات بذور الحرمل في العلاج الشعبي بشكل عشوائي وبدون دراسة علمية مسبقة يحدد فيها التراكيز الملائمة للاستعمال البشري وذلك لسميتها الوراثية إذ أحدثت طفرات عديدة في دنا DNA جذور نبات البصل فضلا عن أحداثها تشوهات كروموسومية متعددة.

2- عزل المكونات الكيميائية الفعالة لبذور الحرمل وتحديد تأثيراتها السمية في نظم بايولوجية متعددة.

3- تقييم السمية الوراثية لبذور نبات الحرمل باستعمال نظم بايولوجية أخرى كاستعمال الثدييات كنموذج تجريبي ومقارنتها مع نتائج هذه الدراسة.

4- اجراء دراسات في محاولة استعمال مستخلصات بذور الحرمل في تثبيط الأورام وذلك لأنه سبب تثبيطا عاليا للانقسام المايتوزي لخلايا جذور نبات البصل.

5- أجراء دراسات معمقة أخرى لتقييم السمية الوراثية للنباتات الطبية الأخرى والمستعملة في الطب الشعبي.

المصادر

REFERENCES

المصادر العربية

- ابو خطوة، احمد نبيل.(1992).موسوعة أبو خطوة.دار القبلة للثقافة الإسلامية .جدة. المملكة العربية السعودية .1575 ص.
- الأيوبي،عمر.(2003). الطب البديل: التداوي بالإعشاب والنباتات الطبية. كتاب مـــــترجم تأليف اندرية شوفاليه .أكاديميا انترناشيونال- بيروت- لبنان.
- بيضون،لبيب.(2003).طب المعصومين.الطبعة الثانية.موسسة الاعلمي للمطـــــــــبوعات.لبنان .120-121 ص.
- جازع ، صالح حسن وعبد الحميد ، ديانا باسم . (2012) . التأثير التثبيطي للمستخلص الـــــــمائي والكحولي لأوراق نباتي الحرمل *P.harmala* وعين البزون فـــــــي بكتريا *staphylococcus aurous* مجلة أبحاث ميسان .**8** (16):1-20.
- جرجيس ، رافعة قادر والحيالي فادية موفق. (2010). التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodalmi* . مجلد أبحاث كلية التربية الأساسية المجلد **10** (1): 476-490 .
- جواد ، رشا عبد الامير ، عبد اللطيف ، سعد حمد ومحمد ، عبد الهادي جلال .(2014, أ). دراسة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل *P.harmala* على طبقات قشرة المخيخ الأرانب البيض . مجلة جامعة كربلاء العلمية . المجلد **12**(1):141-147.
- جواد ، رشا عبد الامير ، عبد اللطيف ، سعد حمد ومحمد ، عبد الهادي جلال .(2014,ب) دراسة وظيفة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل *P.harmala*على بعض الإنزيمات والبروتينات لذكور الأرانب البيض . مجلة كربلاء العلمية . مجلد **12**(1):30-34.
- حسن،نجلاء،طارق.(2010). التأثير التثبيطي للمستخلص القلويدي الخام لنباتي الداتورة والحرمل والزيوت الطيارة لنباتي الاس والقرنفل ودراسة التدخل بينها في نمو عدد من الفطريات المـــمرضة للنبات . مجلة تكريت للعلوم الصرفة .161 (3):29 -35 .
- الحسيني ،مع الله تركي .(2009).تأثير مستخلصات بذور الحرمل *P.harmala* في بعض جوانب الأداء الحياتي لخنفساء الحبوب الشعرية *Trogoderma granarium* Everts .مـــجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة .المجلد **1**(1):68 -76 .
- الحسيني ، خلود أبراهيم حسن و جلادت،محمد صالح جبرائيل.(2006). استـــــخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة ال DNA في تشخيص أصـناف البطاطا المكثرة خارج الجسم .مجلة دهوك ،**11** (1): 52-59.

- حمد ، احمد عباس وحمد ، رقيب عاكف . (2012). تقييم فاعليه بعض المستخلصات النباتية في خفض تلوث حبوب الذرة الصفراء بالسم فيوموتيزين B1 . مجلة العلوم الزراعية العراقية .47-39:(3)**43**.
- حمزة ، عباس كاظم .(2005). دراسة التأثير السمي للمستخلصات المائية لبذور نبات الحرمل *P.harmala* ضد الأطوار اليرقية للذبابة المنزلية *Musca domestic* . مجلة جامعة القادسية .13-1:(2)**10** .
- الخزرجي،عبد الجبار ؛عبد الحميد،.كلبوي ؛عبد الحميد،أمير ؛خضير عباس،سهيلة غفوري ومؤيد عبد الصاحب تويج.(2013).التأثير التثبيطي للمستخلص المائي لبذور الحرمل في نمو بعض أنواع البكتريا المرضية.مجلة العلوم الزراعية العراقية.مجلد **44**(2):234_240 .
- السعدي ، نمارق هادي منصور .(2008) .تأثير المستخلص القلويدي الخام لأوراق المديد *Convolulus arvensis* في الانقسام الخلوي .رسالة ماجستير . كلية العلوم .جامعة بغداد.
- الشنوى، فوزية احمد .(2009). تأثير مزيج مستخلص بذور نبات الحرمل*P.harmala* وأوراق نبات الشيح *Ardenisia herba* – abla ضد الاميبا الحالة للنسيج *E.histolydica* في الزجاج . المجلة العراقية للعلوم، **50**(3):290-295.
- الشنوي ، فوزية احمد ونور نهاد باقر .(2011). دراسة تأثير مزيج المستخلص الكحولي لبذور الحرمل ومخاريط السرو في حيوية الرؤيسات الأولية المشوكة الحبيبية *E.granulosus* داخل الجسم الكائن الحي . مجله مركز بحوث التقنيات الإحيائية. مجلد **5** (2):44 -52 .
- شهاب ،عمر حمد ؛ حمادي، صباح ابراهيم ومهدي،نغم خضير.(2010). التأثير الطارد للمستخلصات المائية والكحولية والزيتية لبذور نبات الحرمل على إناث بعوض *Culexpipiens* molestus(Forskal) .مجلة جامعه الانبار للعلوم الصرفة.المجلد **4**(1):1_6.
- العبيدي ،شيماء صباح مهدي.(2004).تأثير بعض المستخلصات النباتية الخام على الانقسام الخلوي.رسالة ماجستير،كلية العلوم للبنات.جامعه بغداد. العراق .146 ص.
- الغامدي،صالح؛الطاهر،عثمان أحمد والحسن،جعفر محمد .(1994).مدخل إلى علم الوراثة . دار المريخ للنشر ،السعودية،303صفحة.
- الغيثار، هيلة بنت علي بن عبد العزيز.(2007). دراسة وراثية وسايتولوجية لبعض سلالات الذرة الشامية (*Zea mays* L.) .رسالة ماجستير، كلية العلوم ،جامعه الملك سعود،المملكة العربية السعودية.193 صفحة.
- القرني،عوض احمد .(2012).تقييم السمية الوراثية لمستخلص المائي لأوراق نبات الحرمل الرازي على جينوم الجرذان.أطروحة دكتوراه .كلية العلوم.جامعة الملك عبد العزيز.

- كاظم،صالح مهدي.(2013). تأثير بعض المستخلصات النباتية في هلاك يرقات بعـــــــوض *Culex pusillus* macquart.مجلة ميسان للدراسات الأكاديمية.مجلد **12** (23):147-152.
- مجيد،سامي هاشم ومحمود ،مهند جميل.(1988).النباتات الأعشاب العراقية بين الطب الشعبي البحث العلمي ،مجلس لبحث العلمي ،الطبعة الأولى . بغداد.
- محسن،عقيل. (2009).طب الإمام الكاظم (ع). الطبعة الرابعة .دار الحجة للطباعة والنشر والتوزيع .بيروت.
- محمود ،مهند جميل.(2008).كيمياء النباتات الطبية .طبعه الأولى.مطبعه أنوار دجلة.بـــغداد.95 ص.

المصادر الأجنبية

- Abbasipour ,H.;Mahmoud ,M.;Rastegar,F. and asij,M.(2010). Insecticidal activity of *Peganum harmala* seed extract against the diamomond baek moth Plutella Xylostella . Bulletin of Insectology, **63**(2):259-263.
- Abbassi,K,Z.;Atay-Kadiri,A. and Ghaont,S .(2003 a).Biological effects of alkaloids extracted form three plant of Moroccan arid areas on the desert locust. Physiol. Entomol, **28:**232-236.
- Abd EL-Hamied, N.R. (2001): Cytogenetic effects of water extracts of some umbelli – ferrous plants on *Vicia faba*. M.Sc. Thesis of Cytogenetics, Fac. Of Girls, Ain Shams Univ.
- Abd-Alwahab,A.I.(2010).The effect of extracted crude ethanolic alcohol of *Petroselinum crispum* seeds and leaves on white mice and some of cancer cells lines. Thesis University of Technology of Applied of Sciences. Biotechnology, pp:129.
- Abdel-Fattah, A. F. M.; Matsumoto, K.; Gammaz, H. A. K. and Watanabe, H.(1995) "Hypothermic effect of harmala alkaloid in rats: involvement of serotonergic mechanism". Pharmacol. Biochem. Behav, **52:** 421-426.
- Abdel-Tawab,F.M.; Eman,M.F.; Bahieldin,A.; Asmahan,A.M.; Mahfouz,H.T.;Hala,F.E. and Moseilhy,O.(2003a). Marker –assisted selection for drought tolerance in Egyptian bread wheat(*Triticum aestivum* L.).Egypt .J.Genet.Cytol,**32**(1):43-64.
- Abderrahman,S.M .(1997). Effect of *Peganum harmala* extract on root tips of *Allium cepa*. Cytobios , **90:** 171-174.
- Abderrahman, S.M. (1998). Cytogenetic effects of *Peganum harmala* extract on maize root tips. Cytology, **63:** 283–291.
- Abdulameer, S.F.(2013).Study the effect of excessive consumption of Alchohlic and Aquatic Extract of *Peganum harmala* on liver and spleen tissue of male Albino mice .Babylon Unit .J. Pyr .App. Sei, **3**(112):927-933 .

- Abo- elkheir, Z.A. and Abo- elkheir, G.M.(1992). Cytological effect of certain active constituents of *Peganum harmala*. 1. Effects of hormonal and harmine alkaloids on mitosis of *Allium cepa*. J. king Saud Univ. Science, **4:** 37-45.
- Afanador-Kafuri, L.; Minz, D.; Maymon, M. and Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from Tamarillo, Passiflora, and Mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. Phytopathology , **93:** 579-587.
- Ailemys, C. V.; Yesenia ,R . S.; Antonia, C. R. M.; Gladys, P. A.; Nidia, F. E.; Axel ,M.R.; Taimy ,R.R.; Ana Margarita ,B.B.; Yana, G.T.; Nelvis, S.M.; Maria, E.A.; Consuelo ,G.T and Rodolfo, O.A .(2013). *In vivo* genotoxic evaluation of biological and organic pesticides and fertilizers. Science International, **1:**98-102.
- AL-Asadi, R. M. S . (2008). Effect of arak and harmala plant extracts on growth inhibition of *Mauginiella scaettae* Cav.in laboratory. Date palm Research Center , J. of Basrah,**7**(1):31-39.(In Arabic).
- Al-Dosari,N.H;Alnajim,E.A.;Al-Mansour,N. A.A. and Muhsen,H. (2008) . Evaluate the efficiency of some vegetable oils against insect cortical white on palms. . Date palm Research Center , J. of Basrah,**7**(1):47-60.(In Arabic).
- AL-Dulaimi,F.H.A.; Al-Hamairy,A.K.A. and Mughier, A. H.(2013). Prevalence of cryptosporidium Sp. and treatment by using some plants extracts in AK-Hilla cityl Babylon province. Babylon University J. P. A. Sci. ,**21**(4):1211-1220.
- AL-Izzy,M.Y.(2010).Antimicrobial effect of aqueous and alcoholic extract of *Peganum harmala L*. seeds on two types of salivary isolated microorganisms in Al-Ramadi city. J. of King Abdul aziz University-Medical Sciences. JKAU Med. Sci, **17**(4): 3-17.

- Al-Mizrakchi, A.(1998). Adherence of mutants Streptococci on teeth surfaces: microbiological and biochemical studies .Ph. D Thesis.; University of AlMustansiriya.
- Al- Rawi , A.andChakravarty , H.L. (1988). Medicinal plants of Iraq, 2nd editoin. Baghdad Iraq .Ministry of agriculture and irrigation. pp. 109.
- Altshuler,M.L.(2006).PCR Troubleshooting:the essential guide. Caister Academic Press.pp:80.
- Amer, S. (1965). Cytological effects of pesticides 1-mitotic effects of N-methyl-1-naphthyl carbamate sevin. Cytologia , **30:** 175-181.
- Antonsie-wiez,D .(1990). Analysis of the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* under influence of Leda krin. Folia Histochem. Cytobiologica, , **26:** 79-96.
- Arshad, N.; Zitterl-Eglseer, K.; Hasnain, S. and Hess, M. (2008).Effect of *Peganum harmala* or it's beta-carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. Phytother. Res,**22** (11):1533-1538.
- Asgarpanah,J. and Ramezanloo,F.(2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. Afr. J. Pharm. Pharmacol,**6**(22): 1573-1580.
- Askari,E.;Al-Khalifa,N.S.;Ohmura,T.;Al-Hafedh,Y.S.;Khan,F.A.;Al-Hindi,A .and Okawara,R.(2003).Molecular phytogeny of seven data plam (*Phoenix dactylifera* L.),cultivars.by DNA fingerprinting . Pak.J.B, **35:**223-230.
- Assaeed, A.M. and Al-Doss, A.A.(1996). Effect of *Rhazya stricta* Leachate on Seedling Growth and Survival of Some Range Plant Species. JKAU: Met., Env., Arid Land Agric. Sci, **7:** 13-20.
- Assunção, I.P.; Alfenas, A.C.; Coelho, R.S.B. and Lima, G.S.A. (1999). Análise isoenzimática de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose foliar da cebola. Summa Phytopathol, **25:** 293-298.

- Astulla, A.; Zaima, K.; Matsuno, Y.; Hirasawa, Y.; Ekasari, W.; Widyawaruyanti, A.; Zaini, N. C. and Morita, H. (2008). Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. J. Nat. Med, **62:** 470–472.
- Atef, A.A.H.; Abd EL-Hamid, N.R.; Abd ELHady, E.A. and AL-Ansary, A.M. (2011). Cytogenetic effect of insecticide Tellition and Fungicide Dithane M 45 on meiotic cells andseed storage proteins of *Vicia faba*. Journal of American Science, **7** (1): 19-25.
- Atienzar, F.A. andJha ,A.N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutat. Res, **613:**76-102.
- 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.; Paola, V.; Awadhesh, N.J,.andMichael, H.D. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. Mutat. Res, **521:**151-163.
- Awasthi,A.K.;Nagaraja,G.M.;Naik,G.V.;Kanginakudru,S.;Thangavelu,K. and Nagaraju,J.(2004).Genetic diversity and relationship in mulberry (Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays BMC Genetic,**5**(1):1471-1486.
- Badr, A. and Elkington,T.T. (1982). Antimitotic and chromotoxic activities of Isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. Env. Experi. Bot, **2:** 265-270.
- Badr, A.;Hamoud ,M.A. and Haroun, S.A.(1985). Effect of the herbicide Gespax on mitosis, mitotic chromosomes and nucleic acids in *Vicia faba* L. root meristems. Proc Saudi Biological Society, **8 :**359-370.

- Baeshin, N. A.; Qari, S. H.; Sabir, J. M.; and Alhejin, A. M.(2008).Biochemical and molecular evaluation of genetic effects of *Rhazya stricta* leafs extract on *Aspergillus terreus*.Saudi J. of Biol. Sci, **15:**25-33.
- Baeshin, N.A.; Sabir, J.S.M. and Qari, S,H. (2009). Cytogenetic and molecular evaluations of genetic effects of leaf extract of *Rhaza stricta* (Decne) on Allium cepa root tip- meristems. Egypt J. Genet. Cytol, **38:** 73-83.
- Baum ,B.R.; Mechands,S.; Penner,.G.A. and Edin,A.B.(1998). Establishment of ascheme for the identification of Canadian barley(*H.vulgare* L.) six row cultivars using RAPD diagnostic bands.Seed Sci.Technol.,**26:**499-462.
- Baumung,R.;Simianer,H.and Hoffmann,I.(2004).Genetic diversity studies in far animals. Asurvery Journal of animal breeding and genetics , **121:**361-373.
- Becker,W.M.(1986).The world of cell . Benjanum Cummings Publisling Company,Inc. New York.pp:882.
- Berrougui, H.; Martín-Cordero, C.; Khalil, A.; Hmamouchi ,M.; Ettaib, A.; Elisa-Marhuenda, E.; Herrera, M.D.(2006). Vasorelaxant effects of harmine and harmaline extracted from *Peganum harmala* L. seed's in isolated rat aorta. Pharmacol Res .J, **54**(2): 150-157.
- Bian, D.; Li, G. and Zhang, H.(1987). Effect of harmine on the immune function of mice .Zhongguo Yaoli Xuebao, **8:**477-480.
- Bown,D.(1995).Encyclopaedia of herbs and their uses.Dorling Kindersley, London .ISBN, **75**(13):20-31.
- Budavari, S. O.; Neil, M .(1996).The merck index.12thed.CRC Press,PP:4644_4645.
- Bunkari, N.;Choi, J.H.; Jeon CW.; Park HW.; Kim ,W.H.; Khan, M.A. and Leet , S.H .(2008). Phytochemical Studies of the Alkaloids from *Peganumharmala* .Appi.Chem, **12** (1): 101-104.
- Camparoto, M. L.; Teixeira, R.O.; Mantovani, M. S. and Vicentini, V.E.P. (2003). Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and Bauhinia candicans Benth

infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. Genetics and Molecular Biology, **25:** 85-89.

- Carita, R.; Marin – Morales, M. (2008). Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to Indus trial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere, **72:**722-725 .
- Cenkci, S.; Yildiz, M.; Cigerci, I.H. and Konuk, M. (2009). Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Chemosphere, **76:** 900-906.
- Chen, Y.; Zhang, L.; Zhou, Y. and Chen, Z. (2000). Inducing somatic meiosis like reduction at high frequency by caffeine in root tip of *Vicia faba*. Mutat. Res, **20**(1): 67-72.
- CIPM.(2009). Centre for Invasive Plant Management (CIPM). Invasive Plant Information - Worst Weeds Centre for Invasive Plant Management .
- Dawson,I.K.;Chalmers,K.J.;Wauh,R.and Powell,W.(1993).Detection and analysis of genetic variation in Hordeum spontaneum population from lsrsel using RAPD marker .Molecular Ecology, **2:**151-159.
- De Wolf ,H.; Blust,R.and Backeljau,T.(2004).The population genetic structure of *Littorina littorea* (Molluscas: Gastropoda) along apollution dradient in the Scheldt estuary (the Netherlands)using RAPD analysis. Science of the Total Environment , **325:**59–69.
- Derakhshanfar,A. and Mirzaei,M.(2008). Effect of *Peganum harmala* (wild rue) extract on experimental ovine malignant. Theileriosis pathological and parasitological findings. On derstepoort Journal of Veterinary Research, **75:**67–72.
- Dewey, W.C. and Miller, H.H. (1969). X-ray induction of chromatidexchanges in mitotic and Gl Chinese hamster cell pretreated with colcemid. Exp. Cell Res, **57:**63-70.

- Dewick, P. M.(2009). Medicinal natural products :biosynthetic approach 3rd ed .Chichester ,U K Witey .pp. 539.
- Duan, C.; HU, B.; Jiang, X.; Wen, C. and Wang, Y.(1998).Genotoxicity of water samples from dianchilake near kunming ,detected by the *Vicia faba*using micronuclus test. Environ and Molecular Mutagenesis, **31:**36-41.
- Duman, C.; Altunkaynak,E.; Aslan, A.; Büyük,I. and S. Aras,S.(2015). Application of molecular markers to detect DNA damage caused by environmental pollutants in lichen species. Genetics and Molecular Research ,**14** (2): 4637-4650.
- El- Khawas, S.A. and Shehala, M.M.(2005). The allelopathic potentialities of Acacia and Eucalyptus prostrate on monocot (*Zea mays* L.) and dicot (*Phasiolus vulgaris* L.) plants. Biotechnology, **4:** 23-34.
- El-Ameen,T.(2013).Molecular markers of drought tolerance in bread Wheat.African Jouranal,Biotechnology,**12**(21):3148-3152.
- El-Badawy ,A .A. and Ali, H. N. (2000).Control of directly excited structural dynamic model of an F-15 tail section using positive position feedback , proceedings of SPIE Seventh International Symposium on Smart Structures and Materials, Newport Beach, *USA.*
- El-Dwairi, Q. A. and Banihani, S. M. (2007). Histo-functional effects of *Peganum harmala* on male rat's spermatogenesis and fertility.Neuro Endocrinol Lett,**28**(3):305-310.
- El-Gendy , M. A.M and El-Kadi ,A. O.S. (2009). *Peganum harmala L*. differentially modulaters cytochrome P 450 gene expression in Human Hepatoma HepG2 cell. Drug Metabolism Letters, **3:** 212-216.
- El-Ghamery, A.A.; El-Kholy,M.A. and Abou-ElYousser,M.A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn2+ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. ,Mutation Research , **537:**29–41.

- 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*. Cytologia , **55:** 209-215.
- El-Khodary, S.; HabibA.and Haliem A. (1990). Effect of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. Cytologia.**55:**209-215.
- Ellsworth, D. L.; Rittenhouse, K. D. and Honeycutt, R. L. (1993). Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. Bio techniques, **14:**214–216.
- El-Saad, M. and El-Rifaie, M.(1980). *Peganum harmala*. leaf its use in certain dermatoses. Int. J. Dermatol, **19:**221-222.
- Enan, M.R.(2006). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to detect the genotoxic effect of heavy metals. Biotechnol Appl Biochem, **43:** 147-154.
- Encyclopedia of Life,2013.(EOL).https:// en.wikipedia.org/ wiki/ *Peganum harmala*.
- Eren,Y. and Ozata,A.(2014).Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. Rev Bras Farmacogn, **24:**51-59.
- Ernst,W.H.O.(2004). Vegetation, organic matter and soil quality. In: Doelman, P.;Eijsakkers, H.J.P. (eds) Vital soil: function, value and properties. Amsterdam, Elsevier, 41–98.
- Fachinetto, J.M.; Bagatini, M.D.; Silva, A.C.F. and Tedesco, S.B. (2007). Efeito anti-proliferativo das infusões de Achyrocline satureioides DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, Rev. bras. farmacogn, **17**(1): 49-54.
- Farajollahi, A.; Tavili, A.; Gholinejad, B.; Darini ,J. and Hossein, P. (2012).Investigation and compare the allelopathic effect for different tissues

of *Peganum harmala* in different amounts on the *Bromus tectorum* germination and growth characteristics. Ecopersia ,**1** (3) :217- 226.

- Farouk, L.; Laroubi, A .; Aboufatima, R.; Benharref, A. and Chait, A.(2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L. possible mechanisms involved .J.Ethnopharmacol, **115:**449-454.
- Fawzia,I.; Mohammed,Z. and El-Ashry,M.(2012). Determination of the genotoxic effects of *Trigonella foenum graecum* L. extracts in stored *Pisum sativum* seeds.Asian. J.Agric.Sci,**4**(4):264-269.
- Fernandes, T.C.C.; Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales,M.A .(2007). Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide, Pest. Biochem. Physiol, **88:** 252–259.
- Fiskesj, G. (1993). The *Allium* test in wastewater monitoring, Environ Toxicol Water Qual, **8:** 291-298.
- Fiskesjo, G.(1985). The Allium test as a standard in environmental monitoring, Ditas , **102:**99-112.
- Fiskesjo, G.(1997). Allium test for screening chemicals evaluation of cytological parameters In: Wang W., J.W. Gorsuch and J.S. Hughes (Eds.). Plants for environmental studies, Lewis, New York, USA .p: 308-333.
- Ford, J.H. and Correl, A.T.(1992). Chromosome errors at mitotic anaphase. Genome , **35:** 702 – 705.
- Franck, A. and Jha, A.N .(2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: a critical review. Rev. Mutat. Res, **613:** 76-102.
- Frison, G. D.; Favretto, F.; Zancanaro, G.; Fazzin,S. and Ferrara,S.D.(2008). A case of b-carboline alkaloid intoxication following ingestion of *Peganum harmala* seed extract. Forensic Science International, **179:**37-43.
- Fukui, K. and Nakayama, S .(1996). Plant Chromosomes: Laboratory Methods. CRC Press, New York. pp: 1–17.

- Gagne, R.; Tanguay, R. and Laberge,C .(1971). Differential staining patterns of heterochromatin in man. Nat. New boil, **232:** 29-30.
- Ganguly, S.; Bhattacharya, S.; Mandi, S. and Tarafdar, J. (2010): Biological detection and analysis of toxicity of organophate and zadirctinbase, insecticides in *Lathyrus sativus* L. , Ecotoxicology , **19:** 85-95.
- Gaviraj, E.N.; Babu, G.R. and Murthy, U.D.(1998).Antibacterial activity guided isolation of harmine from *Peganum harmala* seed by bioautograghy.Indian Drags, **35:**471-474.
- Glasby, J.S.(1987). Encyclopedia of the alkaloids. London: Plenum Press, pp: 58-66.
- Goel, N.; Singh, N.; Saini, R.(2009). Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala L.*) using 6-benzylaminopurine preconditioned seedling explants. Nat. Sci, **7:**34-129.
- Gomurgen, A.N. (2005). Cytological effect of potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. Cytologia, **70:** 119-128.
- Grant, B.F.; Harford, T.C.; Dawson, D.A.; Chou, P.S.; Dufour, M. and Pickering, R.P.(1992). Prevalence of DSM–IV alcohol abuse and dependence: United States. Alcohol Health Res, **18:**243–248.
- Grayson, T.H.; Cooper, L.F.; Atienzar, F.A.; Knowles, M.R. and Gilpin, M.L.(1999). Molecular differentiation of *Renibacterium salmoninarum* isolates from worldwide locations. Appl.Environ ,Microbiol, **65:**961-968.
- Grise,H.;Holm.J.;Ensen,A.G.;Mathiassen,H.,Kjaer,B.;Rasmussen,S.K.(1994). Distribution of RAPD markers on a linkage map of barley .Heredites, **120:**267-273.
- Guzin, K.M.; Serdal, S. and Irem, U. (2010).Assessment of genotoxic effects of both on wheat (*Triticum aestivum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by using RAPD analysis. Bull. Environ. Contam. Toxicol, **84:** 759-764.

- Haliem, A.S. (1993). Cytological effects of the herbicide sencor on mitosis of *Allium cepa*. Egypt Journal of Botany, **33:**93-104.
- Hamden,K.; Masmoudi,H.; Ellouz,F.; Elfeki,A. and Carreu,S. (2008). Protective effects of *Peganum harmala* extracts on thiourea induced diseases in adult male rat.J.of Environmental Biology,**29**(1):73-77.
- Hammer,O.; Harper,D.A.T. and Ryan, P.D.(2001). PAST: Palaeontological statistics software package for education and analysis .Paleontologia Eletronica ,**4**(1):1-9.
- Hamouda,C.;Amamou,M.;Thabet,H.;Yacoub,M.;Hedhili,A.;Bescharnia,F.; Ben salah ,N.; Zhioura,M.; Abdelmumen,N. and El mekki Ben Brahim, N.(2000). Plant poisonings from herbal medication admitted to a Tunisian toxicologic intensive care unit ,1983-1998. Veterinary and Human Toxicology, **42:**137-141.
- Hassan,G.M. and Yassein,A.A.(2014). Cytogenotoixcity evaluation of water contaminted with some textile Azo Dyes using RAPD marker and chromosomal aberrations of onion(*Allium cepa*) root cells.Egypt. J. Genet. Cytol, **43:** 39-57.
- Hemmateenejad, B.; Abbaspour, A.; Maghami, H.; Miri, R. and Panjehshshin, M. R.(2006). Partial least squares. Based multivariate spectral calibration method for simultaneous determination of beta- carboline derivative in *Peganum harmala* seed extract. Anal. Chim. Acta,**575**(2): 290-299.
- Herraiz, T.; Gonzalez. D.; Ancin-Azpilicueta,C.; Aran, V.J. and Guillen, H.(2010).B-carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO).Food Chem.Toxicol, **48:**839-845.
- Hoessel,R.;Lecleret,S.;Endicott,J.A.;Nobel,M.E.;Lawrie,A.;Tunnah,P.; Leoset,M.;Damiens,E.;Marie,D.;Marko,D.;Niederberger,E.;Tang,W.;Eisenbr and,G. and Meijer,L.(1999).Indirubin,the active constituent of achinese

antileukemia Medicine ,inhibit cyclin dependent kinases .Nature Cell Biology, **1:**60-67.

- Hoshina ,M.M.(2002). Avaliac¸a˜o da possı´vel contaminac¸a˜o das a´guas do Ribeira˜oClaro -municı´pio de Rio Claro, pertencente a` bacia do rio Corumbataı´, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*, Trabalho de conclusa˜o (Bacharel e Licenciatura - Cieˆncias Biolo´ gicas), Universidade Estadual Paulista, Rio laro/SP, p: 52.
- Hu, T.J.; Fan, B.T.; Linng, J.; Zhao, S.; Dang, P.; Gao, F.; Dong, M.X.; Preston, P.M. and Yin, H. (1997). Observations on the treatment of natural haemosporidian infections by total alkaloid of *Peganum harmala* L. in cattle. Tropical Animal Health and Production, **29**(4): 72–76.
- Ilbas, A.; Gönen, U. Yılmaz, S.; Dadandı, M.Y. (2012). Cytotoxicity of *Aloe Vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells. Turkish Journal of Botany, **36:** 263-268.
- Irena,k.(2005).Synthetic natural comarins as cytotoxic agent .Curr.Med Chem.Anti Cancer Agent , **5:**29-46.
- Jbilou,R.; Ennabili,A. and Sayah,F.(2006). Iusecticidal activity for medicinal plant extracts against *Triboium castanenm* (Herbst) (coleopteran:Tene brionidae).Afr.J.Bio technal,**5**(10):936-940.
- Kabarity, A. and Malallah ,G.(1980). Mitodepressive effect of Khat extract in the meristematic region of *Allium cepa* root tips. Cytologia , **45:**733-738.
- Kamel,S.;Ibrahim,L.;Afifi,A.andHamza,S.(1970).Major alkaloid constituents of the Egyptian plant. *Peganum harmala*". UARJ, Vet. Sci, **7:**71 – 86.
- Karaismailoglu,M.C.;Inceer,H. and Hayirlioglu-Aaza,S.(2013).Effects of Quizalofop-p-Ethyl herbicide on the somatic chromosomes of *Helianthus annuus* (Sunflower).Ekoloji ,**22**(89):49-56.
- Kartal, M.; Altun, M. L. and Kurucu, S.(2003). HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. J. Pharmaceut. Biomed. Anal, **31:** 263–269.

- Khoshzaban,F; Ghafarifor,F. and koohsari,H,R.J.(2014).*Peganum harmala* aqueous and ethanol extracts effects on lesions caused by *Leishmaniamajor* (MRHO IR 75/ER)in Mice . Jundishapur .J. Microbiol,**7**(7):1-6.
- King,R.C. and Stansfield,W.D.(1990).Adictionary of genetics. 4th ed.,Oxford University Press ,New York –Oxford,pp.188.
- Knoll, M.F.; Silva, A.C.F.; Tedesco, S.B. and Canto-Dorow, T.S. (2006). Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion *Allium cepa* root-tip cells. Genet. Mol. Biol, **29**(3):539-542.
- Korpe, A.D. and Aras, S. (2010): Evaluation of copper induced stress on egg plant (*Solanum melongena* L.) seedlings at the molecular and population levels by use of various biomarkers. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **550** (1): 45-55.
- Kumar, S.; Kumaria, S.; Sharma, S.K.; Rao, S.R. and Tandon, P.(2011).Genetic diversity assessment of *Jatropha curcas* L. germplasm from Northeast India. Biomass Bioenergy, **35**(7): 3063-3070.
- Kuras, O.; Pritchard, J.; Meldrum, P.I.; Chambers, J.E.; Wilkinson, P.B.; Ogilvy, R.D. and Wealthall, G.P.(2009). Monitoring hydraulic processes with automated time-lapse electrical resistivity tomography (ALERT). Comptes Rendus Geosciences - Special Issue on Hydrogeophysics , **341:** 868–885.
- Kurás, M.; Nowakowska, J.; Sliwinska, E.; Pilarski, R.; Ilasz, R.; Tykarska, T.; Zobel, A. and Gulewicz, K.(2006). Changes in chromosome structure mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. J. Ethnopharmacol, **107:** 211-221.
- Kutcher,H.R.;Bailey,K.L.; Rossnagel,B.G. and Legge,W.G. (1996). Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch(*Cochliobolus sativus*)resistance in barley Genome, **39:**206-215.

- Labra, M.; Fabio, T .D.; Grassi, G.; Regondi, S. M. G,.; Bracale, M. and Vannini, C.(2003). AFLP analysis as biomarker of exposure to organic and inorganic genotoxic substances in plants. Chemosphere, **52:** 1183–1188.
- Lala,S.;Pramanick,S.;Mukhopa-dhya,S.; Bandyopadhyay,S. and Basu,M.K. (2004).Harmine evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery system. J. of Drug Targeting,**12**(3):165-75.
- Lamchouri, F.; Settaf, A.; Cherrah ,Y.; Hassar, M.; Zemzami, M.;(2000).In vitro cell toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. Fitoterapia, **71:** 50-54.
- Lamchouri, F.; Settef,A.; Cherrah,Y.;Zemzami,M.; Lvoussi,B.; Zaid,A.; Atif,N. and Hassar,M.(1999)**.** Antitumor principles from *Peganum harmala* seeds.Therapie,**54**(6): 753-758.
- Lawley, P.D. and Brookes, P. (1963).Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. Biochem. J, **89:**137-138.
- Leme, D,M. and Marin – Morales, M.A. (2009) *Allium cepa* tast in euvironmeutal monitoring : are view on its application . Mutat. Res , **82:**71-81.
- Levan, A. (1938). The effect of colchicine on root mitosis in *Allium cepa* Hereditas , **24:** 471-486.
- Liman, R.; Akyıl, D.; Eren, Y. and Konuk,M .(2010). Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium Test. Chemosphere, **80:** 1056-1061.
- Liu, J.F.; Mauzerall, D.L.; Horowitz, L.W.; Ginoux, P. and Fiore, A.(2009). Evaluating intercontinental transport of fine aerosols: (1) methodology, global aerosol distribution and optical depth. Atmos. Environ, pp:1-12.
- Liu, W.; Li, P.J.; Qi, X.M.; Zhou, Q.X.; Zheng, L.; Sun, T.H. and Yang, Y.S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. Chemosphre , **61:**158- 167.

- Liu, W.; Yang, Y.S.; Zhou, Q.; Xie, L.; Li, P. and Sun, T. (2007). Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. Chemosphere, **67**(6):1155-1163.
- Lopez, S.P.; Peon, J.M.M. and Ordas, C.J.V. (2004), "Managing knowledge: the link between culture and organization allearning**"** ,Journal of Knowledge Management, **8** (6): 93-104.
- Love, A. and Love, D. (1975). Plant chromosomes. Lubrecht and Cramer Ltd, Monticello, NY.
- Lynch ,M. (1990). The estimation of relatedness by DNA fingerprinting .Molecular Biology and Evolution, **7:**478-484.
- Ma ,T.H.; Xu, C.; Mcconnell, H.; Rabogo, E.V. and Arreola, G.A.(1995) The improved *Allium* Lroot tip micro nucleons assay for clastogenicity of environmental pollutants. Mutat .Res , **334:**185-195.
- Mahmoudian, M.; Jalilpour, H..and Salehian, P.(2002). Toxicity of *Peganumharmala*: Review and a case report. Iran J Pharmacol Ther, **1:**1–4.
- Marko, D.; Schatzle,S.;Friedel,A.;Genzlinger,A.;Zankl,H.;Meijer, L. and Eisenbrand,G.(2001).Inhibition of cyclindependent Kinase 1 (CDK1) by Indirubin derivatives in human tumour cells. British Journal of Cancer ,**84**(2):283-289.
- Martinez-Culebras, P.V.; Barrio, E.; Suarez-Fernandez, M.B. and Garcia-Lopez,M.D.(2002). RAPD analysis of *Colletotrichum* species isolated from strawberry and the design of specific primers for the identification of *C. fragariae*. *J.* Phytopathol, **150:** 680-686.
- Massaro, E. J. (2002**).** Handbook of Neurotoxicology . Human Press. pp:237.
- Massoud, M.; Jalilpour, H. andSalehian ,P. (2002). Toxicity of *Peganumharmala*: Review and a Case Report. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, **1:** 1–4.

- Mateuca, R.; Lombaert, N.; Aka, P.V.; Decordier, I. and Kirsch-Volders, M.(2006). Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimie, **88**(11):1515–1531
- Mburu, D. and Hanotte, O. (2005). A practical approach to microsatellite genotyping with special reference to livestock population genetics. ILRI Biodiversity project A manual prepared for the IAEA/ILRI training course on molecular characterization of small ruminant genetic resources of Asia, ILRI, Nairobi, Kenya.
- Mederios,M.D.C. and Takahashi,C.S.(1987).Effects of luffa operculata on *Allium cepa* root tips cell.Cytologia, **52:** 255-259.
- Mekki ,L.(2014). Genoprotectivity of methanol and ethanol extracted leaf sap of Trigonella *foenum-graecum* using *Allium cepa* root assay. Acta Biologica Hungarica, **79**(2): 1-12.
- Mekki, L.;Mohammed, A.H. and Mansour,H .(2015).Genotoxic effect of *Peganum harmala* extracts on the growth of *Vicia faba* L. and DNA using nuclear microsatellites. Pak. J. Bot, **47**(3): 995-1006.
- Mekki,L.(2013). Effects of crude aqueous and ethanolic extracts of *Peganum harmala* L. Seeds on cytogenetical and growth traits of *Vicia faba* L. Plants.Afr.J.biotech,**2**(5):1-11.
- Mercykutty, V.C. and Stephen, J.(1980). Adriamycin induced genetic toxicity as demonstrated by the Allium test. Cytologia, **45:** 769–777.
- Minija, J.; Tajo, A. and Thoppil, J.E. (1999). Mitoclastic properties of *Mentha rotundifolia*. L. J. Cytol Genet, **34:** 169-171.
- Mirzaie, M.; Nosratabadi, S.J.; Derakhshanfar, A. and Sharifi, I.(2007). Antileishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the *in vitro* growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug.Vet Arhiv , **77:**365-375.
- Misra,P.; Khaliq,T. and A.Dixit. (2008). Antileishmanial activity mediated by apoptosis and structure based target study of peganine hydrochloride

dehydrate: An approach for rational drug design. J. Antimicrob. Chemother, **62**(5): 998-1002.

- Mohamed, O.N. (2000). Mutation and cytogenetic effect of some bio fertilizers. Ph.D. Thesis of cytogenetics, Fac. of Girls, Ain Shams Univ.
- Mohamed, S.S. (2004). Molecular, ultrastructural and cytological characteristics of *Allium cepa* Meristems treated with some medicinal plant extracts. M.Sc. Thesis of cytology, Fc. of Girls, Ain Shams Uinv.
- Mohammad,M.H; Kodhum ,H.E.M.and Ali,Z.A.(2010) .Cytotoxic effect of Induction *Peganum harmala* L. extract and of apoptosis in Cancer and Cell linc .Iraqi Journal of Cancer and Medical Genetics,**3**(1):11-16.
- Mohammed, M.L.(2011).The role of *Peganum harmala* L. extract on activity of p53 on some cancerous cell lines. Iraqi. J.Biotech ,**10**(1). 77-88 .
- Mohammed,K,A.(2010).Comparative activity of *Peganum harmala* seeds extract and ridampicin againsd *Brucella abortus* experimentally injediou in Mice. Al-Musausiriya J.Sci,**21**(4) : 9-16 .
- Molnar,S.J.;James,L.E. and Kasha,K,J.(2000).Inheritance and RAPD tagging of multiple genes for resistance to blotch in barley .Genome, **43:**224-231.
- Moura, D.J.; Richter, M.F.; Boeira, J.M.; Henriques, J.A.P. and Saffi ,J.(2007). Antioxidant properties of b-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. Mutagenesis, **22:** 293–302.
- Morell, R.; Liang,Y.; Asher,J.H.; J.L.Weber, J.L.; Hinnant,J.T.; Winata,S.; Arhya,I.N. and Friedman,T.B.(1995). Analysis of short tandem repeat (STR) allele frequency distributions in a Balinese population. Hum. Mol. Genet, **4:** 85–91.
- Movafeghi, A.; Abidini, M.; Fathoazad, F.; Aliasgharpour, M.; Omidi, Y. (2009). Floral nectar composition of *Peganum harmala* L. Nat. Prod. Res, **23:**301-308.

- Mullis,K.B. and Faloona,F.(1987).Specific synthesis of DNA invitro via apolymerase catalyzed chain reaction ,Methods Enzymol Neuro Endocrinal Lett, **28** (3):305-310.
- Nagpal, A. and Grover, I.S. (1994). Genotoxic evaluation of some systemic pesticides in *Allium cepa* following in situ and direct treatments I-Mitotic effects. The Nucleus, **37:** 99- 105.
- Nandi, P.; Talukder,G. and Sharma,A.(1998). Plants against cancer some aspects. Nucleus, **41**(12): 53-86.
- Nwakanma, N.M.C. and Okoli,B.E.(2010). Cytological effects of the root extracts of *Boerhaavia diffusa* on root tips of *Crinum Jagus* . Eur. Asia J. Bio. Sci, **4:** 105-111.
- Nwakanma, N.M.C.; Odeigah,P.G.C. and Oboh,B.O. (2009). Genotoxic effects of *Gongronema latifolium* and *Vernonia amygdalina* using the Allium test. In: BooK of Proceedings, 4th UNILAG Conference and Fair, Nigeria, **21**(220:81-90.
- Olorunfemi, D.I.; Okoloko, G.E.; Bakare, A.A.; Akinboro, A. (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of cassava effluents using the *Allium cepa* test, Research Journal of Mutagenesis, **1:** 1-9.
- Onyenwe, C.N.(1983). Cytological effects of seed extracts of Abrus procatorius on the mitosis of *Allium cepa* and the effect of root extract of Boerhaavia diffusa on mitosis of *Crassocephallum biafrae*. University of Port Harcourt, Port Harcour.
- Osama, M.S. (2002). Molecular genetic studies on irradiated wheat plants. .Ph.D. Thesis. Department of genetics, Faculty of agriculture, Ain shams university.
- Ozmen, A. andSummer, S. (2004). Cytogenetic effects of kernel extracts from *Melia azedarach* L., Caryologia, **57:**290–293.

- Panda, B. B. and Sahu,U.K .(1985). In-duction of abnormal spindle func-tion and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* by the organophosphorus insecticide fensulfothion. Cytobios, **42:** 147-155.
- Parekh, J.; Nair, R. and Chanda, S. (2005). Preliminary screening of some folklore medicinal plants from western India for potential antimicrobial activity. Indian J. Pharmacol, **37:** 408-409.
- Parsons, A.F.; Williams, D.A.J .(2000). Radical cyclisation reactions leading to polycyclics related to the Amaryllidaceae and Erythrina alkaloids. Tetrahedron , **56:** 7217-7228.
- Patel, K.; Gadewar, M.; Tripathi, R.; Prasad,S.K. and Patel ,D.K. (2012). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bio analytical aspects of beta-carboline alkaloid Harmine‘‘. Asian Pac. J. Trop. Biomed, **1:**660-664.
- Paterson,C.; Giese ,H. and Linda-Kaursen,I.(1991).DNA markers in plants improvement .In:Advances in Agronomy .Spark,D.L.(ed.).Academic press.New York, **46:**39-89.
- Pathak,G.P.(1999). Study of mitotic activity and chromosomal behavior on carmioisine treated root merister of *Allium cepa* L. M.Sc. dissertation subwitted to central,department of botany ,Tribhuvan university, kathmands ,Nepal.
- Patil, B. C. and Bhat,G.J.(1992). A comparative study of MH and EMS in the induction of chromosome aberration on lateral root meristem in *Clittoria ternatia* L. Cytologia, **57:**259-264.
- Patlolla, A.K.; Berry, A.; May, L. and Tchounwou, P.B. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: A Pilot Study on the Environmental Monitoring of Nanoparticles. International Journal Environmental Research and Public Health , **9:** 1649-1662.
- Phillips,R. and Rix, M.(1991).Perennials. Perennials early .UK .Pan., New York. pp**:**63.

- Prasad, G. and Das, K. (1977) .Effects of some growth substances on mitosis. Cytologia, **42:**323-329.
- 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.
- Pulpati, H.; Biradar, Y.S. and Rajani, M. (2008). Highperformance thin-layer chromatography densitometric method for the quantification of harmine, harmaline, vasicine, and vasicinone in *Peganum harmala*. J. A.O.A.C. Int, **91:** 1179-1185.
- Qari,S.H.M.(2010).DNA-RAPD fingerprinting and cytogenetic screening of genotoxic and antigenotoxic effects of aqueous extracts of *Costus Speciosus* .JKUA .Sci, **22**(1):133-152.
- Raghuvanshi, S. S. and Singh, A.K. (1976).Effect of gamma rays on growth and karyokinetic activity in *Trigonella foenum graceum* L. Cytologia, **41:**177-186.
- Rank, J. and Nielsen, M. H. (1993). A modified Allium test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. Hereditas , **118:** 49-53.
- Rashan,L.J.; Adaay, M.H. and AL-khazraji, A.L.(1989).In vitro antiviral activity of the aqueous extract from the seed of *Peganum harmala* .Fitotherapia, **60:**365_367.
- Ravindran , P.N.(1971). Cytological effects of folidol. Cytologia, **36:** 504 - 508.
- Reib,J. (1975).Mycotoxin poisoning of *Allium cepa* root tips II reduction of mitotic index and formation of chromosomal aberrations and cytological abnormalities by patulin, rubratoxin band diacetoxy scirpenol. Cytologia , **40:**703-708.
- Reiter,R.S.;Williams,J.G.K.;Feldmann,K.A.;Rafalski,J.A.;Tingey ,S.V. and Scolinik,P.A.(1992).Global and local genomic mapping in arab dopsis thaliana by using recombinant in bread lines and RAPDs. Proceeding of the

National Academy of Sciences of the United State of America, **89:**1477-1481.

- Renjana,P.K.; Anjana,S. and Thoppil,J.E.(2013).Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay.Int.J.Pharm.Sci,**5**(2):311-316.
- Rietjens, G. J.; Kuipers, H.; Adam, J. J.; Saris, W. H.; Breda van, E.; Hamont van, D. and Keizer, H.(2005). Physiological, biochemical and psychological markers of overreaching. Int.J. Sports Medicine, **26:**16-26.
- Roshchina, V.V. (2001). Molecular – cellular mechanisms in pollen allelopathy.Allelopathy Journal, **8:** 11- 28.
- Saad, B.;AbouAtta, B.S.; Basha,W.; Hmade,A.; Kmail,A.; Khasib,S. and Said,O. (2008).Hepericum triquetrifolium derived factors down regulate the production levels of LPS-induced nitric oxide and tumor necrosis factor – in THP cells .Evidence Based Complementary an Alternative Medicine, **2011:**1_7.
- Saggoo, M.I.S.; Kumari, S. and Bindu, P. (1991). Cytological effects of indian medicinal plants I. mitotic effects of leaf homogenate of *Tylophoraindica* L. on *Allium cepa* L. Cytologia, **56:** 633-637.
- Sambroak,J.; Fritch ,E.F.and Maniatis,J.(1989).Molecular cloning ,a laboratory Manual 2nd edition .Cold spring Harbor laboratory press, New York.
- Sanchez-Ramos, J.R.(1991). Banisterine and Parkinson s disease. Clin Neuropharmacol , **14:**391-402.
- Sathiyamoorthy, P.; Lugasi-Evgi, H.; Schlesinger, P.; Kedar, I.; Gopas, J.;Pollack, Y. and Golan-Goldhirsh, A. (1999). Screening for cytotoxic and antimalarial activities in desert plants of the negev and bedouin market plant products. Pharm. Biol (Formerly Int. J. Pharmacogn.), **37:** 188-195.
- Savva, D. (1996). DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology. Toxicol. Ecotoxicol. News, **3:**110-114.

- Savva, D. (1998).Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects.Ecotxicol .Environ, **41:**103-106.
- Schneiderman,N.; Antoni,M.H. and Lornson,G.(1997).Cogntive behavioral stress management and secondary preventionin HIV/ ADIS.Psychology and AIDS Exchange, **22:**1-8.
- Sehgal, R.; Roy, S. and Kumar, V.L. (2006). Evaluation of cytotoxic potential of latex of Calotropis procera and podophyllotoxin in *Allium cepa* root model. Biocell ,**30**(1): 9-13.
- Seidemann, J.; Pimenta, L. and indl,G.(2005). World spice plants, Springer Verlag, Heidelberg, **1:** 274-275.
- Shahverdi, A.R.; Ostad, S.N.; Khodaee, S.; Bitarafan, L.; Monsef-Esfahani, H.R.; Jamalifar, H.; Nikavar, B. and Mohseni, M. (2008). Antimicrobial and cytotoxicity potential of *Peganum harmala* smoke.Pathlogy Magazine, **4**(15): 236-240 .
- Shao, H.; Hung, X.; Zhang, Y. and Zhang, C. (2013). Main Alkaloids of *Peganum harmala* L. and their different effect on dicot and monocot , **41:** 145-149.
- Sharma, C.B.S.R. (1983). Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. Current Science , **52:** 1000-1002.
- Sharma, S.; Nagpal,A. and Vig,A.P. (2012). Genoprotective potential of *Brassica juncea* L. Czern. against mercury induced genotoxicity in *Allium cepa*. Turkish Journal of Biology,**10**(906):1110-1118.
- Sharma,A.K. and Sharma,A.(1980).Chromosome techniques theory and practice, third edition .Butter Worths Company.London.Boston.
- Shehab, A.S. and Adam, Z.M.(1983). Cytological effects of medicinal plants in Qatar III. Mitotic effect of water extract of *Anastatica hierochuntico* L. on *Allium cepa*. Cytologia , **48:**343–348.

- Shehab,A.S.(1979).Cytological effects of medicinal plants in Qater I. Mitotic effects of water extract of *Pulicaria crispa* on *Allium cepa*. Cytologia, **44:**607-613.
- Sheheb,A.S.(1980).a.Cytological effect of medicinal plants in Qatar II.Mitotic effect of water extract of *Teucrium pilosum* on *Allium cepa* .Cytologia, **45:**57-64.
- Shieh, S.; Ikeda, M.; Taya, Y. and Prives, C. (1997). DNA damageinduced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell, **91:**325-334.
- Shonouda,M.; Osman,S.; Salama ,O.and Ayonb,A.(2008).Toxical effects *Peganum harmala* . leaves on the coton leaf worm, *Spodoptena Littoralis* Boisel and its Parasibids Microplidis rufivetris Kold . Pak.J.Biol. Sci.,II, **4:**546-552.
- Shukla, R.; Sharmas, B.; puri, D.; Prabhu, K.M.; Murthy,P.S .(2000) . Medicinal plants for derdment of diabetes mellilyts. Ind. J.Clin. Biochem , **15:**169-77.
- Silva, S. B. S.; Garcia, C. F. S.;Mata S.S.; Oliveira d.B,; Estevam S.C.; Scher.R.; Pantaleao .M.S. (2011) Genotoxicity and cytotoxicity of *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae, on the root meristem cells of *Allium cepa*. Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn , **21**(1): 92-97.
- Singh, S. K..; Nene, Y. L. and Reddy, M. V. (1990). Influence of cropping systems on *Macrophomina phaseolina* in soil. Plant Dis, **74:**812–814.
- Smaka-Kincl, V.; P. Stegner, M.; Lovka,M. and Toman,M.J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. Mutation Res, **368:** 171-179.
- Sobhani, A.M.; Ebrahimi, S.A.and Mahmoudian, M.(2002).An in vitro evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L .seed extract and it s beta-carboline alkaloids .J. Pharm. Sci, **5:**19-23.
- Stansfield,W.D.(1969).Genetic. McGrow-Hill companies ,Inc. New York ,Schochen books,pp:395.

- Sudhakar, R.; Gowda, N. and Venu, G.(2001).Mitotic abnormalities induced by silkdyeing industry effluents in the cells of *Allium cepa.* Cytologia, **66:**235-239.
- Sunar ,S.; Aksakal,O. Yildrim ,N. and Agar, G.(2009).Determination of the genotoxic effects of *Verbascum speciosum* Schrad. extracts on corn (*Zea mays* L.) seeds.Rom. Biotechnol. Lett,**14**(6): 4820-4826.
- Suparna ,P.andKundu,R.(2015).Heavy metal induced genotoxicity detection by RAPD in alligator weed .International Journal of Engineering Technology Science and Research(IJETS R),**2** (9):1-12.
- Taspinar, M.S.; Guleray, A.; Nalan, Y.; Serap, S.; Ozkan, A. and Sedat, B.(2009). Evaluation of selenium effect on cadmium genotoxicity in *Vicia faba* using RAPD. J. Food. Agric. Environ, **7**(3&4):857-860.
- Tedesco, M.(2007). Snowmelt detection over the Greenland ice sheet from SSM/I brightness temperature daily variations, Geophys. Res. Lett,**34**(10):502-504.
- Teixeira, R.O.; Camparoto, M.L.; Mantovani, M.S. and Vicentini, V.E.P. (2003). Assesment of two medicinal plants *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays, Genetics and Molecular Biology, **26**(4):551-555.
- Thais,C.; Dania .E.C. and Maria.A.(2007).Mecchanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluratin herbicide.Post Biochem,Physiol,**88**(3):252-259.
- Tinker,N.A.; FortinM,G. and Mather,D.E.(1993).Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationship in spring barley .Theor.Genet, **85:**976-984.
- Tipirdamaz, R.G.; mürgen, A.N.; Kolankaya, D. and Doğan,M .(2003). Determination of toxicity of pulp-mill effluents by using Allium test. Tarim Bilimleri Dergisi, **9**(1): 93–97.

- Tomsone, L.; Kruma, Z. and Galoburda,R. (2012). Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia rusticana*). World Academy of Science, Engineering and Technology,p. 64.
- Turkoglu ,A.; Duru, M.E.; Mercan, N.; Kivrak, I. and Gezer, K.(2007) .Antioxidant and antimicrobial activities of Laetiporus sulphureus (Bull.) Murill. Food Chemistry, **101:**267-273.
- Turkoglu, S. (2008). Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristems cells of *Allium cepa*. Sci, **7:**71-86.
- Vicentini, V.E.P.; Camparoto, M.L.; Teixeira, R.O. and Mantovani, M.S. (2001). *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissussicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. Acta Scientiarum, **23**(2):593-598.
- Vierling,R. and Nguyen,H.T.(1992).Use of RAPD marker to determine the genetic relationship of diploid wheat genotype, theor .Appl .Genet, **84:**835-838.
- Vig, B.K. (1971) An Increase induced by colchine in the incidence of somatic crossing over in Glycine max. Theor. Appl. Genet.,weed on weeds. Crop Protection, **23:** 915- 922.
- Wang,R.R. and Zhang,X.Y.(1996).Characterization of the translocated chromosome using fluorescence in situ hybridization and random amplified polymorphic DNA on two *Triticum aestivum* thinopyrum intermedium translocation lines resistant to weat streak mosaic or barley yellow dwarf virus. Chromosome Research , **4:**583-587.
- Wang,S.; Wang ,Q.; Wang, Y.; Liu, L.; Wang, X.; Li, G.; Zhang, X. and Zhou, X .(2008).Novel anthraquinone derivative synthesis Via click chemistry approach and their induction of apoptosis in BGC gastric cancer

cell via reaction oxygen species rog dependent mitochondrial pathway .Bio org.Med.Chem.Lett, **18:**6505-6508.

- Waters, J. and Salmon, E.D.(1997). Pathways of spindle assembly. Curr Opin Cell Biol, **9:** 37-43.
- Weigand,F.;Baum,M. and Udupa,S.(1993).DNA molecular marker techniques technical manual .No.20.International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.Alepp,Syria.
- Welsh,J. and McClelland,M. (1990).Fingerprinting genomes using PCR with arbitraty Pimers, Nucleic Acid. Research, **18:**7213-7218.
- WHO, 2013. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine, World Health Organization, p.41.
- Wild,J.;Waugh,R. and Powell,W.(1992).Genetic fingerprinting of the obroma clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. Theor. Appl. Genet, **83:**871-877.
- Williams, J.G.K.; 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,G.O.and Omah,L.E.(1996).Mitotic effects of the Aqueous leaf extract of *Cymbopogon citratus* in *Allium cepa* Root tips .Cytobios,**87**(350):161-168.
- Winter,P.and Kahl,G.(1995).Molecular marker technologies for plant improvement .Word J. of Microbio. and Biotech, **11:**348-448.
- Xuan, T.D.; Tawata, S.; Hong, N.H.; Khanh, T.D. and Chung, i.m.(2004). Assessment of phytotoxic action of *Ageratum conyzoides* L. (billy goat weed) on weeds. Crop prot , **23:** 915–922.
- Ye, H., H. and Gustafson,P.E.(1998). The changes in Russian winter snow accumulation during 1936 – 83 and its spatial patterns, J. Clim, **11:**856 – 863.
- Yi ,H. and Meng, Z .(2003).Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Alium sotivum* and *Vicia faloa*. Mutat Res , **537:**109-114 .

- Yıldız, M.; Cigerci, I.H.; Konuk, M.; Fidan, A.F.and Terzi,H .(2009). Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere , **75:** 934-938.
- Yingxin,L.(1998). *Peganum*. In: Xu Langran & Huang Chengchiu, eds., Fl. Reipubl. Popularis Sin,**43**(1): 123–125.
- Young, S.W. and Young, P.W.(1993). Effect of plant growth regulators on mitotic chromosomes. The Nucleus, **36:** 109-113.
- Zhang,X.Y.;Xin,Z.Y.and Larkin,P.J.(2001).Molecular characterization of a thinopyrum intermedium group 2 chromosome(2Ai-1) on ferring resistance to barley yellow dwarf virus .Genome, **44:**1129-1135.

ABSTRACT

Evaluation of genetoxicity of the aqueous and alcoholic extracts of *Peganum harmala* L. seeds was assayed in onion roots *Allium cepa* as a biological system. Onion roots were subjected to different concentrations of aqueous and alcohol extracts (10,25,50,100,200%) V/ W for different periods(24,48,72) hrs in order to study the effects of these extracts on onion′s root growth and some cytological properties included, (Mitotic index, phase index, proportion and types of chromosomal aberrations), as well as to assess the effect of these extracts on the DNA of onion roots using Random amplification polymorphic DNA (RAPD) technology.

The results revealed that all harmala seeds extracts the aqueous and alcoholic caused a significant reduction of onion root growth, the reduction was positively proportional with the increasing concentrations of the extracts. The half maximal effective Concentration (EC50) against onion′s root growth was 50% in the case of using the aqueous extract while it reached 25% in the case of alcoholic extract. This result indicate the efficiency of the alcoholic extract over the aqueous extract on onion′s root growth.

Results also showed that both harmala seeds extracts resulted in significant reduction of the mitotic index (MI) of onion′s roots tips compared with the control treatment .The reduction of the MI was also positively proportional with the increasing concentrations of the extracts .Although MI was not affected by the increase in duration of exposure .Therefore ,since the concentration 100% and 25% of the aqueous and alcoholic extracts respectively lowered the MI to nearly 50% compared to the control, they were considered sub lethal, whereas the concentration 200% of both extracts which caused a reduction of the MI to nearly 22% compared to control treatment was considered as lethal concentrations. The results showed a significant reduction prophase and significant increase of metaphase in onion′s root cells due to the treatments with both extracts. Moreover high percentages of chromosomal aberrations were also

detected, and these aberrations were also positively associated with the increasing concentration and exposure periods. to The most frequent abnormalities were (Chromosomes stickiness, Chromosomal bridges , Chromosome disturbance and C-mitosis) .Moreover some other infrequent chromosomal abnormalities were also appeared such as (Lagging chromosome ,Star anaphase, Shifting of poles, Polyploidy).

The effect of both harmala seeds extracts was tested on DNA of onion′s roots using a random amplification polymorphic DNA (RAPD). Out of ten random primers used, seven were gave multiple bands for all studied, samples with molecular weights ranged between (90-1400) base pair .The results of random amplification showed that all harmala extract concentrations tested caused damage to DNA which mutations revealed as loss of a single or more band, or appearing of new bands. Additionally the total lost and gained band in samples treated with alcoholic extract reached 43 bands compared to the samples treated with the aqueous extract which revealed 35 bands , This result indicate the effectiveness of the alcoholic extract over the aqueous in it′s effect on DNA of onions roots. Furthermore, The results showed that the total number of the gained bands was more than that of the lost ones for both extracts with most primers used . The total numbers of the new bands in the samples treated with the aqueous extract were 27 bands whereas 32 bands , with alcoholic extract. However ,the total number of lost bands in samples treated with aqueous extract were 8 bands compared to 11 bands with alcoholic extract.

The percentage of the genomic template stability (GTS%) was lowered initially from the concentration 10% for both extracts ,this reduction was negatively associated with the increasing concentrations of the extracts, indicating the existence of great damage to the DNA with the increasing concentrations of the extract. The decrease of GTS in samples treated with alcoholic extract was more than that with the aqueous extract. A highest reduction 78.56% was detected at concentration 25 and 200 % in samples

treated with the aqueous extract, whereas a higher reduction 69.03% was recorded lower at concentration 50% in samples treated with alcoholic extract.

Genetic dendrogram of samples treated with exposed to harmala seeds extracts in addition to the control using Jaccard coefficient of genetic variation and based on RAPD results showed segregation of onion samples treated with aqueous extract from samples treated with aqueous extract from samples treated with alcoholic extract, as well as segregation of the control treatment in a single group, this result confirms the great damages of onions root DNA when treated with harmala seed extracts..

University of Baghdad

College of Education for Pure

Sciences(Ibn Al-Haitham)

Department of biology

Detection of genetoxic effect of *Peganum harmala* L. extracts by using some molecular and cytogenetic markers

A THESIS

Submitted to council College 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

Saif Mohammed Ibrahim

B.Sc. Biology – College of Education for Pure Sciences Ibn AL-Haitham

Supervised by

Dr. Nidhal Niama Hussain

1437 A.H. **2016 A.D.**