Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 17 No. 2 October 2014

AUCES

تأثير عقار اليكولشسن و المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل علي أستحثاث الشذوذ الكروموسومي و الطفرات الوراثية في نبات البازلاء□

هدى شعبان القبى*، أبراهيم على تيكة**

*قسم النبات– كلية العلوم – جامعة مصراتة– ليبيا

** قسم المختبرات– كلية التقنية الطبية جامعة مصراتة– ليبيا

الملخص:

في الآونة الأخيرة لوحظ زيادة استخدام مستخلصات النباتات الراقية في الطب الشعبي لما لها من دور واضح في تحوير نشاط المطفرات الوراثية. ويعتبر نبات الحرمل و اللحلاح من أهم هذه النباتات الطبية . فنبات الحرمل و نبات اللحلاح نباتات برية وهما من النباتات الشائعة الاستعمال للأغراض الطبية العديدة . وقد اكتسبت هذا النباتات سمعة طيبة خلال العقود الأخيرة كمصدر هام للأدوية. تشير الدراسات البحثية ان للحرمل و الكولشسين (مستخلص من نبات اللحلاح) مضار علي السلوك الكروموسومي عليه قدمت هذه الدراسة بغرض إيجاد قاعدة معلومات أساسية عن هذه النباتات الطبية والإجابة علي تساءل مهم جداً إلا وهو هل لمستخلص نبات الحرمل وعقار الكولشسين تأثير ضار علي سلوك الكر وموسومات؟ وهل يعتبر هذان المستخلصان من المطفرات الكيميائية؟. استخدم في هذه الدراسة القمم النامية لبادرات البازلاء حيث نقعت جذورها في المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل وعقار الكولشسين بتراكيز ٠.٠٠٥% (كلا علي حده) لمدة ٢٤ ساعة. تم تثبيت الجذور في محلول كارنوي ثم جهزت الشرائح و تم استخدام صبغة جميزا في صبغ القمم النامية لبادرات البازلاء و تحضيرها للفحص ألمجهري بطريقة الهرس. كما نقعت بذور نبات البازلاء في المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل وعقار الكولشسين بتركيز ٠.٠٠٥% كلا علي حدا لمدة ٢٤ ساعة ثم استنبتت البذور لمدة أربعة أسابيع بغرض دراسة تأثير هذه المستخلصات علي بعض الصفات الظاهرية. بينت نتائج الدراسة إن سلوك الكروموسومات أصبح شاذا في العينات المعاملة بمستخلص الحرمل المائي (٠.٠٠٥%) فظهر الطور التمهيدي (المتعجن و فك حلزنة)، الاستوائي (المتعجن، المبعثرو كسور كروموسومية)،انفصالي (نجمي)، (النهائي مع مسح لجزء من المادة الوراثية وعديد الانوية) عند مقارنتها بالانقسام الميتوزي الطبيعي (الشاهد) . كما لوحظ تشوهات بالمادة الوراثية، كسور كروموسومية ، و تغير في موقع المادة الوراثية بالاضافة لتشوهات بالشكل الظاهري للخلايا المنقسمة. لوحظ علي مستخلص الحرمل المائي بانه يسبب تحسن في نمو النبات فقد شهدت نبات البازلاء زيادة واضحة في الطول و غزارة المجموع الجذري بالإضافة لظهور المحاليق و الاوراق مبكرا عند مقارنتها بالشاهد. اما بالنسبة لبذور البازلاء المعاملة بعقار الكولشسين فقد بينت نتائج الدراسة أن لهذا العقار تأثير شديد علي نمو النبات فقد حدث نقص معنويا جدا في الطول الكلي للنبات. كما لوحظ ظهور ظفرات علي النبات تشمل التورد ،التقزم و التورم كما شوهدت التشوهات خلوية (تشمل استطالة الخلايا) وظهر الشذوذ الكروموسومي خلال الانقسام الغير مباشر للخلايا متمثلا في التعجن وفك الحلزنة للكروموسومات في الطور التمهيدي ، تعجن وظهور الطور الاستوائي النجمي ، كما شوهد تعجن واستعجال أحد الكروموسومات والجسور الكروموسوميه في الطور الانفصالي، وكذلك ظهور النواة الصغيره و وجود الأنوية المتعددة في الطور النهائي. أوضحت نتائج الدراسة إن لعقار الكولشسين ومستخلص الحرمل المائي المستخدمان بتركيز (٠.٠٠٥%) أثر بالغ علي نمو النبات بالاضافة الي ان كل منهم له القدرة علي استحتات الشذوذ الكروموسومي في الخلايا المنقسمة انقساما غير مباشر. يعتبر عقار الكولشسين من العقارات المطفرة و المسرطنة بسبب قدرته علي تكون الاورام علي الجذور بينما يعتبرمستخلص الحرمل من المظفرات التي تسرع نمو النبات و تطوره. عليه ينصح خلال هذه الدراسة التعامل بحذر تام مع كل من الكولشسين و ومستخلص نبات الحرمل والتخلص من أي مخلفات نباتية تمت معاملتها بمستخلصات الحرمل او الكولشسين في مكبات خاصة لما لها من تاثير شديد علي الخلايا النباتية ومحتوياتها الوراثية.

المقدمة:

يرجع تاريخ استخدام المستخلصات النباتية الطبية منذ قديم الازل الي العصور التاريخية القديمة وتطور استخدامها عبر العصور ، لما للاعشاب و النباتات الطبية من قيمة اقتصادية و طبية كبيرة و للدور الذي تلعبه في مكافحة الامراض و صناعة الادوية. لقد عرف القدماء قائمة واسعة من النباتات الطبية واستخدمت بنجاح في معالجة الأمراض فاستخدموا مستخلصات النباتات الطبية و التى تحتوي على العديد من المواد الفعالة ذات القيمة الدوائية والتي تستخدم بصورة مباشرة بتناولها لاحتوائها على المادة الفعالة أو بصورة غير مباشرة من خلال استخلاص المادة الفعالة ودخولها في صناعة الدواء. فالكولشسين المستخدم فى هذه الدراسة هو عبارة عن مادة فعالة تم استخلاصها بواسطة الكيميائيان الفرنسيان پ. س. پلتييهوج وكافنتون (Pelletier PS.at.el, 1820) بصورة نقية من أزهار الزعفران الخريفي *autumn crocus* والذى ينتمى للفصيلة الزنبقية Liliaceae. عرف الكولشسين بانه مركب امينى طبيعى ووصف بقلويد ثلاثي الحلقات وزنه الجزيئى ٣٩٩.٤٣٧، وهومتبلور، ذو لون اصفر و طعمه مر. استعمل الكولشيسين بتركيز ٠.٠٥ % في الإنتاج الزراعي لمضاعفة الكروموسومات في الخلايا النباتية بغرض إنتاج الطفرات الصناعية المتميزة بغزارة الإنتاج وتحسين الصفات سواء كانت أزهار أو ثمار لبعض النباتات الطبية الاقتصادية إذ إن هذه المادة تعمل على منع تكون الخيوط المغزلية الضرورية لعملية انقسام الكروموسومات أثناء الدور الانفصالي مما يؤدي إلى بقاء الكروموسومات في مركز الخلية ومن ثم تضاعف المادة الوراثية.

بالإشارة الى ما تؤكده الدراسات التى اجريت بواسطة (Pickett-Heaps, 1966، Hogetsu et. al. 1978) ان للكولشسين القدرة على تغيير شكل الخلية بالإضافة لوجود تغير ملحوظ فى سلوك الكروموسوم خلال مرحلة الإنقسام اللاجنسى (ملص واخرون, ٢٠٠٣).

يعتبر الحرمل ايضا من النباتات ذات الاستخدامات الطبية حيث تحتوي بذور الحرمل على ثلاث قلويدات هي الحرملين Harmaline وحرمين Harmine وحرملول Harmalol وقد أثبتت البحوث العلمية على هذه القلويدات انها تؤثر بالشلل على الديدان الشريطية وتفقدها القدرة على الحركة فيسهل التخلص منها كما تستعمل في علاج الملاريا المزمنة في بعض البلاد الحارة التي ينتشر فيها هذا النوع من الملاريا، تستخدم ايضا فى علاج الشلل و التهاب الدماغ. ينتمي هذا النبات إلى العائلة الزيجوفيلية Zygophyllaceae ويسمى محليا بالحرمل (Peganum harmal) وهو نبات عشبي شجيري، يتراوح ارتفاعه بين ٣٠ سم الى ١٢٠ سم وينمو غالبا بحالة برية (حسين، ١٩٨١). تؤكد الدراسة التى اجريت بواسطة(متوكل ٢٠٠٧) أن المعاملة بمستخلص أوراق الحرمل أدت إلي ارتفاع في تكرار الدليل الظفوري و حدث ارتفاع في نسبة الخلايا الميتوزية المختلة وكنتيجة للبحوث و التجارب يتضح أن لمستخلصات نبات الحرمل تأثيرات ضارة إذا لم تستخدم بجرعات محددة ولكن مدى الضرر الذي تلحقه بالخلايا و محتوياتها النووية مازال يحتاج للتأكيد مقرونا بأدلة علمية وهذا يجعل للبحث هدفاُ للتوصل لبعض الأدلة عن علاقة مستخلص الحرمل باستحداث الشذود الكروموسومى و بالتالي ظهور الظفرات.

استخدم فى هذا البحث مستخلص بذور الحرمل المائى وكذلك الكولشسين بتركيز ٠.٠٥% لدراسة تاثير كل منهما على حده على السلوك الكروموسومى للخلايا المرستمية فى القمم النامية لجذور نبات البازلاء و كذلك دراسة التشوهات الخلوية و الطفرات التى قد تسببها هذه المستخلصات.

مواد وطرق البحث:

١- نبات التجربة:

نبات البازلاء *Pisum sativum* صنف JULIT العدد الكروموسومي (14). تندرج البازلاء تحت الخضروات، وهي من الفصيلة الفراشية. يتألف النبات من الجذور، السيقان، الأوراق، الثمار، البذور،استخدمت الخلايا المرستمية فى القمم النامية للجذور كنموذج للخلايا المنقسمة انقساما غير مباشر.

٢- شريحة حاوية على الانقسام الغير مباشر فى الخلايا النامية لجذور نبات البازلاء:

نميت بذور البازلاء في الماء في درجة حرارة الغرفة حتى يصل طول الجذور حوالي ٣- ٤سم. قطعت الجذور النامية والحاوية على القمم النامية بطول (٠.٥ – ١ سم) ثم وضعت في مثبت كارنوى لمدة ٢٤ ساعة، نقلت الجذور لمحلول كحولى لحفظ العينات. أجرى تحلل مائى للجذور Hydrolysis وذلك بمعاملتها ١ ع بحامض الهيدروكلوريك عند درجة حرارة ٦٠ م° لمدة حوالي ٥-٦ دقائق. هرس الجزء المريستيمي بواسطة إبرة صداة ثم صبغت العينة بواسطة صبغة جميزا، ثم فحصت الشرائح بالمجهر الضوئى باستخدام العدسة الزيتية.وهذه استخدمت كشاهد.

٢- تحضير شريحة لعينة معاملة بالكولشسين و مستخلص بذور الحرمل المائي لدراسة الاضطرابات الكروموسومية:

استخدمت القمم النامية لجذور البازلاء المنقوعة فى محلول الكولشسين بتركيز٠.٠٥% و فى مستخلص بذور الحرمل (كلا على حدا) لمدة ٢٤ ساعة فى درجة حرارة الغرفة وبعد عملية التثبيت فى محلول كارنوى تم فصل القمم النامية و تعريضها للتحلل المائى ، هرسها ، صبغها بصبغة جميزا ثم فحصها بالعدسة الزيتية.

٣- دراسة تاثير عقار الكولشستن و مستخلص بذور الحرمل على الشكل الظاهري للخلية و تحديد التشوهات الخلوية:

حضرت شريحة دائمة للخلايا المرستيمية فى القمم النامية لجذور نبات البازلاء طبقا لما وصفة (2006، Kamel) فحصت الشريحة تحت قوة تكبير ١٠٠× ، ثم حددت التشوهات الظاهرة على جدران الخلايا ، الانوية و الكروموسومات مع فحص دقيق للشكل الظاهرى للخلية. استخدمت ٥ مكررات لكل معاملة.

٤- الطفرات:

نقعت بذور نبات البازلاء بعقار الكولشسين و مستخلص الحرمل بتركيز ٠.٠٥% (كلا على حدى) لمدة ٢٤ ساعة ثم نميت فى طبق بترى لمدة يومين. نقلت البادرات النامية الى أصص صغيرة و تركت لتنمو لمدة شهر. تم مراقبة التغيرات الظاهرة على النبات و سجلت الطفرات من حيث نوعها و عددها. استخدمت خمس مكررات لكل معاملة.

٥- دراسة تأثير عقار الكولشستن و مستخلص الحرمل على بعض مقاييس النمو:

نقعت بذور نبات البازلاء بعقار الكولشسين بتركيز ٠.٠٥% لمدة ٢٤ ساعة ثم نميت فى طبق بترى لمدة يومين. نقلت البادرات النامية الى أصص صغيرة و تركت لتنمو لمدة شهر ثم سجلت المقاييس الخاصة بنمو النبات خلال فترات زمنية متنقلة (اسبوع' اسبوعين ' ثلاثة و اربعة اسابيع من فترة النمو) و التى تشمل : طول المجموع الخضرى و الجذرى ، الطول الكلى للنبات. استخدمت خمس مكررات لكل معاملة.

٦- التحليل الإحصائى :

أجرى تحليل النتائج إحصائياً باستخدام برنامج SPSS. وقد استخدم تحليل ANOVA ONE WAY, LSD، وذلك بغرض المقارنة بين متوسطات المعاملات المختلفة.

النتـــائج :

١- الاضطرابات الكروموسومية والتشوهات الخلوية لخلايا القمم النامية فى جذور نبات البازلاء المعاملة:

أوضحت نتائج الدراسة (شكل ١) إن معاملة الخلايا المنقسمة بمستخلص الحرمل المائي (٥ملجم/ ١٠٠مل) و الكولشسين (٥%) تسبب فى استحثاث الشذوذ الكروموسومى فقد ظهر التعجن وفك الحلزنة فى الطورالتمهيدى، التعجن و التبعثر فى الطور الاستوائي، التعجن فى الانفصالي ، تعدد الانوية فى النهائي.

بالنسبة للخلايا المعاملة بمستخلص الكولشسين فقط ظهرت ايضا الجسور الكروموسومية في الطور الانفصالي كما شوهدت الانوية الصغيرة، في حين شوهد فى الخلايا المعاملة بمستخلص الحرمل المائي فقط ظهور التلكؤ الكروموسومى كما ظهر مسح في أجزاء من المادة الوراثية شكل (٢).

تؤكد نتائج الدراسة المبينة فى شكل (٣) ظهور تشوهات فى الشكل الظاهري ، كسور كروموسومية وتغير فى موقع المادة الوراثية على الخلايا المنقسمة المعاملة بمستخلص االحرمل والكولشسين (كل على حدى) .

٢- مقاييس النمو Growth Parameters

☆ **طول المجموع الخضرى، الجذرى و الطول الكلى للبادرات :** تشير النتائج المبينة فى الشكل ٤ ان معاملة الخلايا النامية (فى جذير بذور نبات البازلاء) بالكولشسين تركيز ٠.٠٥% و التي تركت لتنمو لمدة شهر قد شهدت بادراتها نقصا معنويا جدا فى طول المجموع الجذرى و الخضرى كما شهد الطول الكلى نقصا عالي المعنوية (P=0.001) بداية من الاسبوع الاول حتى الاسبوع الرابع لنمو البادرات، و يجدر الاشارة ان المجموع الخضرى قد شهد نمو تدريجيا وان كان بطيئا على العكس من ذلك فالمجموع الجذرى شهد زيادة فى النمو و كان ذلك واضحا خلال الأسبوع الاول للنمو.

أكدت نتائج الدراسة الموضحة بشكل ٤ ان معاملة الخلايا المنقسمة فى جذير نبات البازلاء بمستخلص بذور الحرمل المائى (0.05 جم/١٠٠مل) نتج عنه تشجيع نمو البادرات، ووفقا لتحليل LSD , ANOVA ONEWAY فقد لوحظت الزيادة العالية المعنوية فى طولى النبات الكلى و المجموع الخضرى حيث (٠.٠٠١ =P) فى حين ان طول المجموع الجذرى شهد زيادة معنوية جدا خلال الاسبوعين الثالث والرابع (P =0.008). ايضا شوهدت مراحل تطور نمو النبات و

التى تبدءا بالنمو التدريجي للنبات خلال الأسبوع الأول حتى الاسبوع.

☆**عدد الاوراق و المحاليق** :

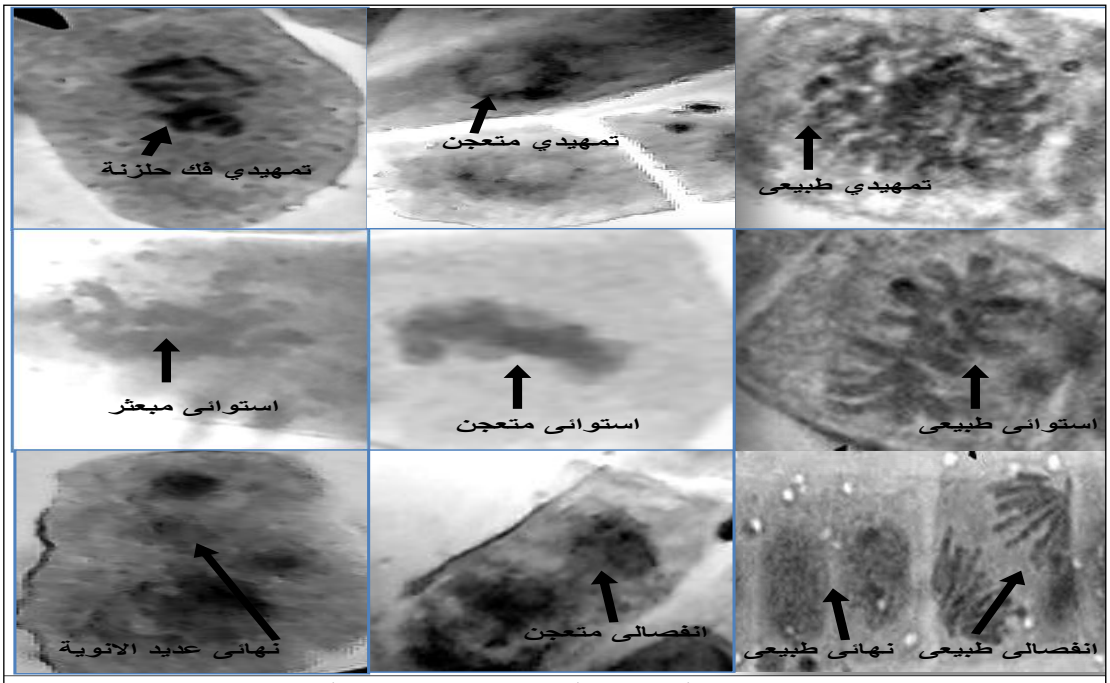
أوضحت نتائج التحليل الإحصائى والمبينة فى شكل (٥) النقص العالى المعنوية و المعنوى جدا فى عدد الاوراق (P=0.001) والمحاليق (P=0.018) على التوالي فى بادرات البازلاء المعاملة خلاياها المنقسمة بالكولشسين. على العكس من ذلك فقد شهدت البادرات المعاملة بمستخلص الحرمل زيادة عالية المعنوية فى عدد الاوراق (P=0.001) كما حين ان عدد المحاليق قد شهد زيادة معنوية جداً(P=0.003).

3 – **الطفرات** :

*التورم : لوحظ على المجموع الجذري لبادرات البازلاء النامية تكون كتل او تورمات وكان عدد هذه التورمات عاليا جدا في الأسبوع الأول ولكنه قل بمعدل ٣ إضعاف فى النباتات النامية لمدة أربعة أسابيع. تؤكد نتائج الدراسة المبينة بالشكل (٦) أن بادرات البازلاء المعاملة بمستخلص الحرمل وكذلك الشاهد لم يظهر عليهما تورمات.

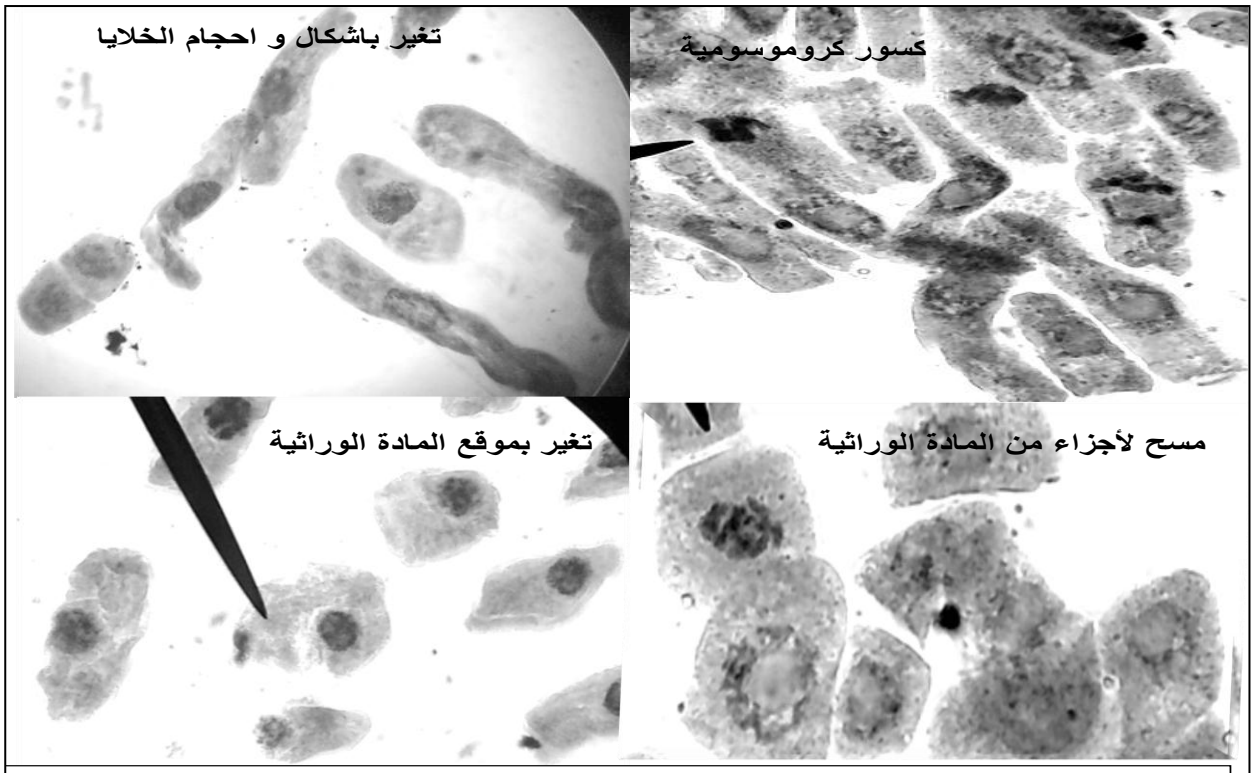
☆ **التورد و التقزم**: : أكدت النتائج المبينة فى الشكل (٧) ظهور حالات التقزم و التورد على البادرات المعاملة بالكولشسين تركيز ٠.٠٠٥% بينما لم تشهد نباتات الشاهد و تلك المعاملة بمستخلص الحرمل مثل هذه الحالات.

☆ **غزارة المجموع الخضرى و الجذرى**: تؤكد نتائج الدراسة المبينة فى شكل (٨) أن بادرات البازلاء المعاملة بمستخلص الحرمل قد شهدت تحسن ملحوظ فى المجموعى الخضرى و الجذرى عند مقارنتها بالشاهد. على العكس من ذلك فقد لوحظ على النباتات المعاملة بالكولشسين قلة فى المجموع الجذرى و تاخر عملية النمو والتطور فى المجموع الخضرى فلم يشهد تكون محاليق كما ان الاوراق تكون متقاربة و سميكة مع ملاحظة قصر النبات

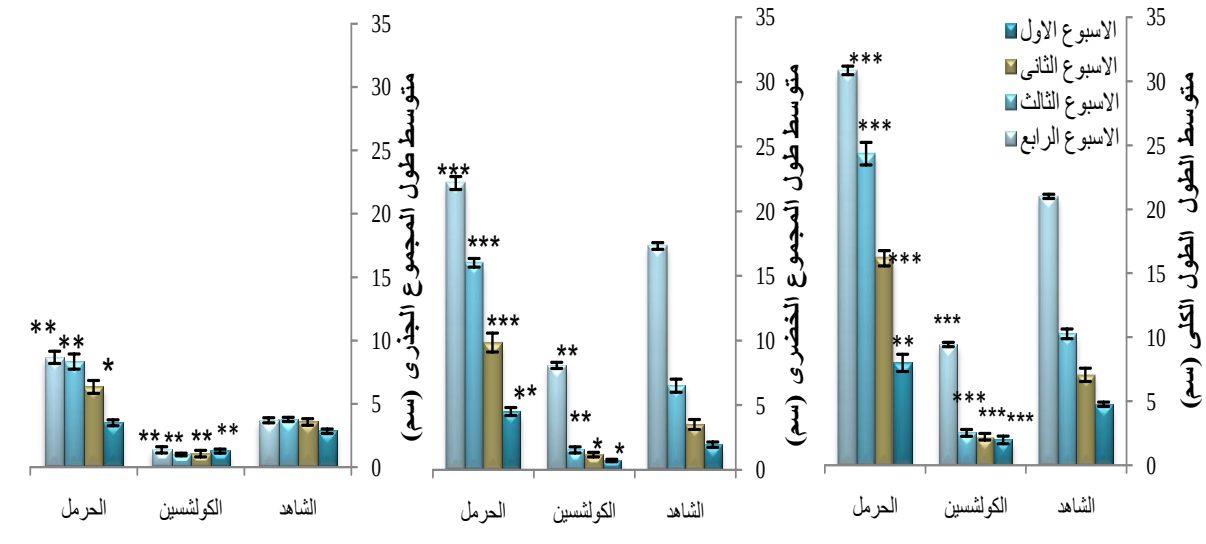


شكل (1) الاضطربات الكروموسومية المشتركة فى خلايا القمم النامية لجذور نبات البازلاء المعاملة بالكولشسين (5%) و مستخلص الحرمل (5جم / 100 مل)كلا على حدى.

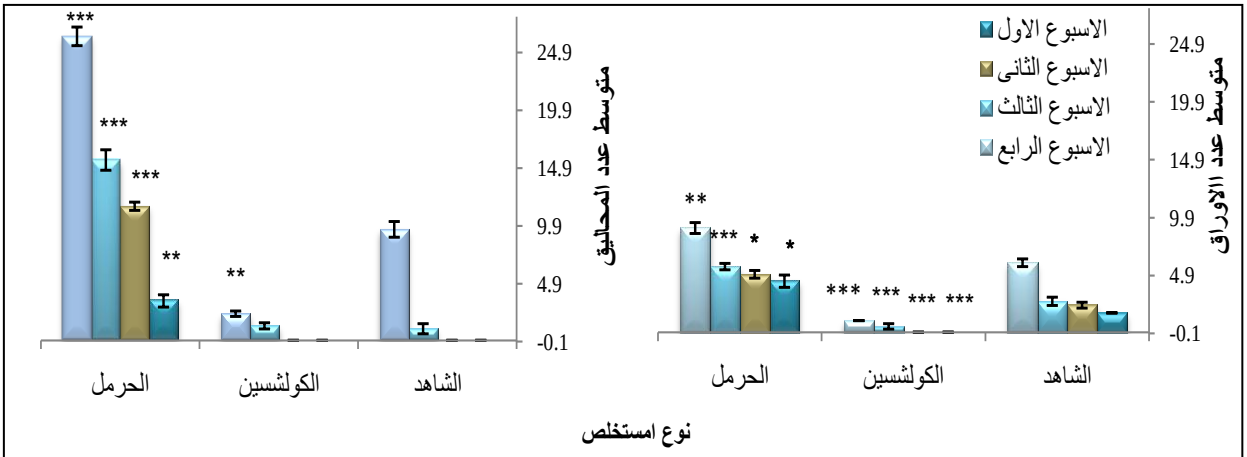
شكل (2) الاضطربات الكروموسومية فى خلايا القمم النامية لجذور النبات البازلاء المعامله بالكولشسين (A) ومستخلص الحرمل المائي (B) كلا على حدى .



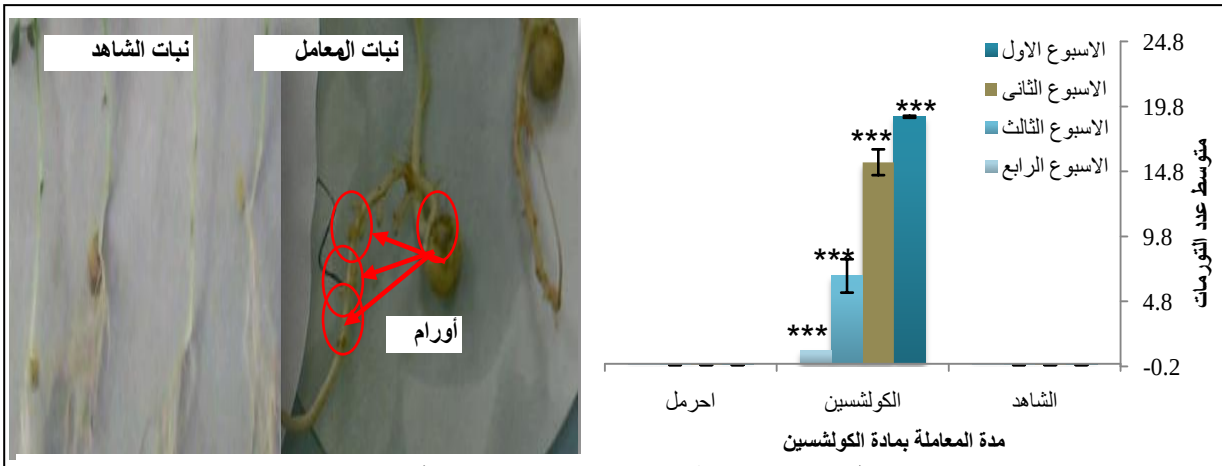
شكل (3) التشوهات بالشكل الظاهرى،كسور كروموسوميةو تغير فى موقع المادة الوراثية فى خلايا القمة النامية لجذور نبات البازلاء المعاملة بالكولشسين (5%) و مستخلص الحرمل (5جم / 100 مل) كلا على حدى.



شكل (4) تأثير المعاملة بالكولشسين ومستخلص بذور الحرمل على الطول الكلى , طول المجموع الخضرى و طول المجموع الجذرى لبادرات نبات البازلاء النامية لمدة اسبوع، اسبوعين، ثلاث و اربع اسابيع



شكل (5) تأثير المعاملة بالكولشسين ومستخلص بذور الحرمل على عدد الاوراق والمحاليق لبادرات نبات البازلاء النامية لمدة اسبوع، اسبوعين' ثلاث و اربع اسابيع



شكل (6) متوسط عدد التورمات المتكونة على المجموع الجذرى لبادرات نبات البازلاء النامية لمدة اسبوع، اسبوعين' ثلاث و اربع اسابيع و المعاملة بمادة الكولشسين و مستخلص بذور الحرمل (كلا على حدى)

شكل (7) ظاهرتي التورد و التقزم فى باذرات البازلاء المعاملة بالكولشسين 0.05%.

شكل (8) تاثير الكولشسين و مستخلص بذور الحرمل على المجموع الخضرى و الجذرى فى بادرات البازلاء النامية لمدة اربع اسابيع

المناقشـــة:

١- الاضطرابات الكروموسومية و التشوهات الخلوية لخلايا القمم النامية فى جذور نبات البازلاء المعاملة:

يتبن من نتائج الدراسة ان كل من مستخلص الحرمل المائى و الكولشسين القدرة على استحثاث الشذود الكروموسومى و يبدو انهما يتقاربان فى التأثير حيث ظهر التشابه فى معظم أشكال الشذوذ كروموسومى يتفق هذا مع ماجاء به Ali et.al., (2000، زينى، ٢٠٠٧ و القبى،2013). ترجع أسباب الاضطرابات الكروموسومية غالبا نتيجة للمعاملة بالمستخلصات المائية للحرمل و الكولشسين ومما يؤكد ذلك هو عدم ظهور هذه الاضطربات فى الخلايا غير المعاملة (الشاهد).

لوحظ ان المستخلص المائى للحرمل و الكولشسين قد اثر على سلوك الكروموسومات و ظهرت اضطرابات متشابه ومتنوعة فى جميع أطوار الانقسام الغير مباشر(التمهيدى، الاستوائى، الانفصالى و النهائى). وترجع اسباب التنوع فى هذه الاضطرابات لما يلى:

*حالات التعجن او ما يعرف باللزوجة الكروموسومية: ترجع مسبباتها كنتيجة لمعاملة الخلايا في مراحلها المبكرة من الانقسام غير المباشر فتتجمع (تلتصق) كروموسومات الخلية عندما يصبح السطح الخارجي لهذه المجموعة الكروموسومية لزج، وهذا النوع من الاضطراب يمنع تتابع المراحل التالية للانقسام وسببه زيادة بلمرة ال DNA فيتعجن وتختفي معالمه حيث تتكون الروابط العرضية بين جزيئات الـ DNA والبروتين في الكروموسومات مما يسبب التصاق الكروموسومات مع بعضها مكونة كتلة كروماتينية غير متميزة (الفيصل،٢٠٠٠) شوهدت اللزوجة الكروموسومية فى التمهيدى، الطور الإستوائي و الطور الانفصالى.كما يمكن تفسير حالات اللزوجة الكروموسومية لزيادة النشاط فى انزيم DNA Polymerase هو المسؤول عن تضاعف ال

DNA وتتفق هذه النتيجة مع ما وصفة (الانصارى وآخرون،١٩٩٩).

☆ **فك الحلزنة**: ترجع اسبابه لقدرة المستخلصات المعامل بها الخلايا المنقسمة على تفكك سلسلتي الـ DNAفيسبب ذلك فى ظهور الكروموسومات طويلة و رفيعة ينتج عنها تقليل الحلزنة .

☆ **استوائى مبعثر** : يعرف ايضا بالمتشتت ويرجع أسباب ظهوره الى تجمع الكروموسومات في مركز الخلية لا تترتب هذه الكروموسومات علي الصفيحة الوسطي كما في الطور الإستوائي الطبيعى وبالتالى فهى تكون غير حرة وهذه الحالة ترجع الى ضعف خيوط المغزل فى عملها وهذه النتيجة تتفق مع ما وصفة (على، ٢٠١٠).

☆ **نهائى عديد الانوية** (**الانوية المتضاعفة**) : تحدث فى الطور النهائي بسبب تجمع الكروموسومات في مجموعات مختلفة العدد وكل مجموعة تحاط بغشاء نووي وبالتالي يظهر بالخلية عدد من الانوية.

ان معاملة الخلايا المنقسمة فى القمم النامية لجذور البازلاء بالكولشسين قد شهدت اضطرابا كروموسومى من نوع الجسور الكروموسومية و النواة الصغيرة و الكبيرة وهذه الأطوار لم تظهر عند المعاملة بمستخلص الحرمل المائي وأسباب ظهور الجسور الكروموسومية ترجع الى اتصال كروموسومين في الطور الانفصالي علي شكل قنطرة Bridge وقد يعزى السبب الى تداخل الانظمة الوراثية المسيطرة على عملية سحب او انفصال الكروموسومات تتفق هذه النتيجة مع (Wagenaar, 1961b& . Gill et.al., 1995) أما عن اسباب تكون نواة صغيرة و كبيرة خلال الطور النهائى يرجع الى عدم التكافؤ فى توزيع المادة الوراثية (القبى و اخرون، ٢١٠٣) او قد يكون بسبب تجمع الكسور الكروموسومية او القطع الكروموسومية المتأخرة فى الانسحاب ففي الطور النهائي نجد أن هذه القطعة الكروموسومية تحيط نفسها أو أن الكروموسوم المتخلف يحيط نفسه بغشاء نووي مكونا ما يعرف بالنواة الصغيرة – Micronucleus بالإضافة إلي النواة الأخرى المحتوية علي بقية المجموعة الكروموسومية فتتشكل انويه صغيرة وهذه قد تفقد لاحقا مما يسبب بالطبع تغيرات وراثية تاثيرها يعتمد على عدد الخلايا المحتوية على هذه الانوية و كذلك نوع الجينات المفقودة فى هذه الانوية (Morris, et.al. 1967).

يظهر فى الخلايا المنقسمة المعاملة بمستخلص الحرمل حالة من الاضطراب يطلق عليها بالتلكؤ الكروموسومى و هذه الحالة لم تشاهد فى الخلايا المعاملة بالكولشسين، ويعزى سبب تلكؤ الكروموسوم الى تاخر كروموسوم أو أكثر في الإتصال ببقية المجموعة الكروموسومية علي خط الإستواء ولكنه يظل أو يبقي حرا في السيتوبلازم (Wagenaar, 1961a; Walter, et,al., 1972). كما أشارت الباحثة (السامرائى، ١٩٩٩) ان الكروموسومات المتاخرة فى الانسحاب لايعود اختلاف بينها بسبب الحركة بل ايضا فى آلية فصل الكروماتيدات الشقيقة .

شوهدت حالات من مسح فى اجزاء من المادة الوراثية على الخلايا المعاملة بالكولشسين و الحرمل. مما يجدر الاشارة اليه ان حالات المسح الواضح فى المادة الوراثية وكذلك الكسور

الكروموسومية ظهرت و بشكل متكرر وملحوظ على الخلايا المعاملة بمستخلص الحرمل وقد يعزى سبب تكرار وظهور هذه الحالة الى فعل المستلخص المعامل به الخلايا (وتتفق هذه النتيجة مع (متوكل ، ٢٠٠٧ . كما ان حالة الكسور الكروموسومية و عدم التكافؤ فى توزيع المادة الوراثية و كذلك الكروموسومات المتأخرة فى الانسحاب و التلكؤ الكروموسومى قد يفسرا النقص الحادث بالمادة الوراثية و الذى يظهر فى صورة فقدان المادة الوراثية فى النواة الرئيسية وهذا يتفق مع ما أشارت إليه السامرائى (١٩٩٩). ايضا تكرار ظهور الكسور الكروموسومية ومسح لأجزاء من المادة الوراثية فى الخلايا المعاملة بالحرمل تشير الى تاثيرات كيميائية متعددة ويتفق هذا مع (Hallak, et.al. , 1999) بمعنى ان مستخلص الحرمل يحوى على اكثر من مادة فعالة تؤثر على سلوك الكروموسومات. فبالاضاقة لاشباه القلويدات وكنتيجة لظهور الشذوذ الكروموسومى، الكسور الكروموسومية والتوزيع الغير متكافى للمادة الوراثية فمن المحتمل ان مستخلص الحرمل يحوى ايضا على مواد مؤلكلة alkylation agents و بخاصة المواد ثنائية الوظيفة

(تحتوي على مجموعتين ألكيل تفاعليتين) والتى تسبب فى ربط جزيئات الـ DNA عرضاً وتحدث كسوراً أو تغيرات كروموسومية (الكبيسى، ٢٠٠٠).

٢-التشوهات الخلوية:

تؤكد نتائج الدراسة ان لمستخلص الحرمل المائى و الكولشسين تأثير على الشكل الظاهرى للخلايا المنقسمة. حيث ظهرت الإشكال الغير منتظمة سوى الشكل المتطاول أو تلك الحاوية على انتفاخ في نهايتها فضلا عن ذلك لوحظ إن جدران بعض الخلايا تكون منحنية. بعض الخلايا المعاملة حدث بها نقص فى الطول مع زيادة فى السمك و هذا يتفق مع ما اشار اليه (Hogetsu, et.al,1978). وقد يرجع السبب فى تأثير مستخلص الحرمل و الكولشسين على شكل الخلية لقدرته للتأثير على صلابة الجدار الخلوي وهذا يتفق مع -(Pickett Heaps.1966). كما قد يعزى السبب لحدوث تميع فى شكل الخلايا وظهور الانحناءات على جدرانها لحدوث خلل فى المكونات الكيميائية للجدار الخلوى بالإضافة لان الكولشسين و مستخلص بذور الحرمل المائى ربما أيضا اثر في ضغط الامتلاء للخلايا مما يجعلها غير منتظمة فى شكلها(القبى واخرون،٢٠١٣).

٣-مقاييس النمو Growth Parameters

طول المجموع الخضرى والجذرى، الطول الكلي للنبات، عدد الاوراق و المحاليق:

لوحظ على البادرات المعاملة بالكولشسين قصر النبات و ضعف المجموع الخضرى حيث قل عدد الأوراق و المحاليق مع تأخر في موعد تكونهما. كما شوهد ضعف المجموع الجذرى لبادرات البازلاء النامية عند المقارنة بالشاهد. عليه تؤكد نتائج هذه ان الكولشسين يعيق عمليتى النمو و التطور وهذا يتفق مع (القبى واخرون ٢٠٠٣) ، على العكس من ذلك فقد لوحظ على البادرات المعاملة بمستخلص بذور الحرمل المائى تحسن فى المجموع الخضرى حيث اظهرت البادرات زيادة فى طول النبات مع زيادة فى عدد الأوراق و المحاليق بالإضافة الى تكون المحاليق مبكرا حيث شوهدت هذه المحاليق بداية من الأسبوع الاول لنمو البادرات. ايضا لوحظ على البادرات النامية غزارة المجموع الجذرى عند المقارنة

بالشاهد وهذا يشير على تحسن فى مقاييس النمو للنبات مما يشير الى ان مستخلص بذور الحرمل قد ساهم فى تحسين مقاييس النمو فى النبات و الذى قد يرجع السبب فى ذلك كما اشار (زينى، ٢٠٠٧) لوجود مواد مضادة للاكسدة حيث تعمل مستخلصات الحرمل على زيادة فى تركيز بعضاً من المواد المانعة للأكسدة. ايضا يحتوى الحرمل على قلويدات مثل الحرملين، الحرمول و الحارمين (Al-Shamma, et.al.1981). كما هو معروف فان القلويدات اذا استخدمت بتراكيز ملائمة فهى تكون مصدر هام لتكوين البروتينات كما أنها تشكل منظمات للنمو والأيض والتكاثر فى النباتات . نستنج من ذلك ان استخدام تركيز ٠.٠٠٥% من مستخلص بذور الحرمل يحفز نمو البادرات .

٣-الطفرات:

***التورد، التورم و التقزم**: شوهدت هذه الطفرات على بادرات البازلاء المعاملة خلاياها المنقسمة بالكولشسين وهذه النتيجة تتفق مع ما اوضحة (الحاجى,١٩٩٢) أن الكولشسين يتسبب في حدوث الطفرات صناعيا Induced –mutation أثناء الانقسام غير المباشر مما ينتج عنه اضطرابات تكون خليط من الخلايا الجسدية بها مادة وراثية مختلفة في عدد الكروموسومات وهذا التغير الحادث بالمادة الوراثية هو الذي يؤدي إلي الطفرة الوراثية . نتيجة لظهور التورمات على المجموع الجذرى وظهور التورد على المجموع الخضرى مع تقزم النبات فانه بذلك يمكن وصف الكولشسين بانه عامل كيميائى مطفر mutagenic ومسرطن carcinogenic.

غزارة المجموع الخضرى و الجذرى: وجد ان بادرات البازلاء المعاملة خلاياها بمستخلص بذور الحرمل لوحظ عليها تحسن فى الطول الكلى مع غزارة المجموعى اخضرى و الجذرى بالاضافة الى ان عملية النمو و التطور كانت أسرع عند المقارنة بالشاهد و كنتيجة للتغيرات الظاهرة على النبات يمكن وصف مستخلص الحرمل بانه منتج نباتى مطفر mutagenic وهذا يتفق مع ماشار اليه (قبيسى، ٢٠٠٤) إذ يمكن للمنتجات النباتية الطبيعية أن تسبب في إحداث الطفرات ، أو تغيير في نشاط المطفر الموجود في الكائنات الحية وذلك عن طريق تنشيط الحالة المطفرة الموجودة في الخلايا activation of promutagen او تنشيط المواد المكونة لمولد الطفرة والموجودة بالخلية وتحويلها إلى مولدات الطفرة.

من خلال مناقشة النتائج نستخلص من هذه الدراسة ما يلى:

* يختلف عمل بعض المستخلصات النباتية وفقا للتراكيز المستخدمة.

* يتسبب تركيز ٠.٠٠٥% الكولشسين المعامل بها الخلايا المنقسمة فى القمة النامية لجذير بادرات البازلاء فى ظهور الطفرات بالإضافة الى التورمات وبذلك يمكن تصنيف الكولشسين كمادة مطفرة ومسرطنة بسبب قدرته على استحتاث الطفرات ، تغيير سلوك الكروموسومات وتكسير الكروموسومات وهذه ظواهر مصاحبة للمسرطنات.

* يسبب تركيز مستخلص بذور الحرمل ٠.٠٠٥% / فى ظهور الطفرات حيث ظهرت صفات جديدة على النباتات المعاملة كما أن تغيير سلوك الكروموسومات

ايضا من الادلة التى تشير لتغير فى المحتوى الوراثى وبالتالى يمكن تصنيفه كمطفر.

*اظهر الكولشسين باعتباره قلويد قدرتة على استحتاث الشذود يرجح انها قد تكون المسبب الرئيسى فى ظهور الطفرات والشذود الكروموسومى.

وبالتالى يتشابه تاثيرها مع الكولشسين من حيث القدرة على تغيير سلوك الكروموسومات، الشذود الكروموسومى و استحثاث الطفرات.

REFERENCES:

Ali BH, Al-Qarawi AA, Bashir AK, Tanira MO (2000): Phytochemistry, Pharmacology and Toxicity of *Rhazya stricta*:*A review phytotherapy Research* 14, 234-239.

Al-Shamma A, Drake S, Flynn DL, Mitsher LA, Srao GSR, Simpson A, Swayaze JK, Vesogll, T (1981): Antimicrobial Agents from Higher Plants: Antimicrobial Agents from *Peganum harmala* seeds. *Jurn. Nat. Prod* 44: 745-747.

Gill B S, Friebe, B, Gill, K S, Endo, T R (1995) and Mechanism of the Diphenyl Amine Reaction for Colorimetric Estimation of Deoxyribonucleic Acid . *Biochemistry* (62): 315-328

Hallak, A M, Lisete, CD , Souza I (1999): Effects of Sorghum (*sorghum bicolor* L.) Root Exudates on the Cell Cycle of the Bean Plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. *Genet. Mol. Biol.* vol.22-São Paulo Mar.

Hogetsu T, Shibaoka H (1978): Effects of Colchicine on Cell Shape and Microfibril Arrangement in the Cell Wall of Closteriumacerosum. *Plant J.* 18:449–453.

KAMEL A E (2006): Karyotype Characterization and Polyploidy Variations in Some Genotypes of *Triticum Aestivum*(L*). Mendel Society-Cytologi-* 71 (2): 169-174.

Morris R, Sears E R (1967): The Cytogenetics of Wheat and Its Relatives. In: Quisenberg, K.S. and Reitz, L.P.(ed). Wheat and wheat improvement. *American society of Agronomy. Madison. USA*. 19-87.

Pelletier PS, Caventon J A. Investigation (1820): *Chim.*14:69 .

Pickett-Heaps DJ. (1966) : The effects of colchicine on the ultrastructure of dividing plant cells, xylem wall differentiation and distribution of cytoplasmic microtubule. Canberra, A.C.T., Australia.

Roberts FM, Wink M (1998): Alkaloids Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. *Plenum Press. New York and London .*

Wagenaar E.B. (1961a): Cytological Studies of The Development of Metaphase I in Triticum Hybrids, II the Lagging Patterns in Two Triploids. *Can. J. Genet. Cyto*. 3:361-371. Co. USA.

Walter V B (1972): Textbook of Cytological Cytogenetics, *The C. V. Mosby*.

المراجـــــع العربيـــــة :

الحاجي ، محمد علي و مجيد، عياد فرج (١٩٩٢): علم الوراثية . الدار العربية للنشر- المملكة العربية السعودية مدينة الملك عبد العزيز للعلوم ص ٨-٥٠.

السامرائى، أسماء (١٩٩٩): دراسة الوراثة الخلوية وبعض *الصفات الخلوية و الفسلجية و نباتات الجيل* الاول الهجين. رسالة ماجستير- كلية التربية بنات- جامعة بغداد.

الفيصل عبد الحسين (٢٠٠٠) الوراثة الجزئية .الاهلية للنشر والتوزيع .الطبعة الاولى

الكبيسى، خالد.(٢٠٠٠): علم الاحياء الجزيئى. الطبعة الاولة، دار صفاء للنشر والتوزيع، عمان.

القبى، هدى و العربى، الشريف (٢٠١٣): تأثيرعقار الكولشيسين تركيز 0.05% على سلوك الكروموسومات وبعض الصفات المظهرية والفسيولوجية لبادرات البازلاء .جامعةحلوان- مصر.

الأنصاري ،عثمان عبد الرحمن وسلامة ،ناصر محمد ،١٩٩٩ .علم الوراثة .منشورات ELGA

حسين، فوزي طه قطب (١٩٨١). النباتات الطبية زراعتها ومكوناتها. دار المريخ للنشر، ٣٥٦ صفحة.

على ، أيهاب عبد الرازق كامل - منشورات أم القرى ٢٠١٠ - المملكة العربية السعودية .

قبيسي حسان . (٢٠٠٤م) معجم الأعشاب والنباتات الطبية . بيروت ـــ لبنان منشورات محمد علي بيضون- دار الكتب العلمية -الطبعة السادسة.

متوكل ، محمد بن حامد زيني .(٢٠٠٧) رسالة ماجستير - دراسة التأثيرات الوراثية لمستخلص أوراق نبات الحرمل في لخلايا الإنشائية لقمة جذور نبات الفول البلدي، جامعة الملك بن عبدالعزيز، السعودية.

ملص ، سحرا ومصطفى أبو ارجيع (٢٠٠٣م). علم العقاقير والنباتات الطبية . دار البازوري العلمية للنشر والتوزيع ، الطبعة العربية .

Ass. Univ. Bull. Environ. Res. Vol. 15 No. 1 March 2012

Effect of colchicine drug and water extract of *Peganum harmala* seeds on the induction of chromosome abnormality and mutation in Peas Plant

H.S. Elgubbi* and I.Take **

***Department of Botany, Faculty of Science,**Deparment of Biotechnology, Faculty of Biotechnology- Misurata University - Libya**

In late time, uses of flowering plant extraction has been noted in public medicine because of their clear roles to modify mutagens activity. Both Colchicum autumnale and Peganum harmala are wild type plants and they had widely uses in many medicine purposes. This plant earned good reputation during the old testaments as an important source for drugs. Some research studies indicate to that harmala and colchicines drug have harmful effect on chromosome behaviour, thus this study presented to find the basic information on this medicinal plants, in addition to give answer on an important question, do water extract of harmala seeds and colchicines drug have harmful effect on chromosome behaviour? And do both extractions are chemicals mutagens?

Study carried out on pea's seed that soaked in colchicine solution and water extract of harmala seeds (individually) and at concentration of 0.05% for 24 hours. Seeds left to grow for a month, reading for growth measurements recorded.

For slides preparation, Root tip of peas seed soaked in colchicine solution and water extraction of harmala seeds (0.05% individually) for 24 hour. In the next day, root tip fixed for 24 hours in Carnoy's fixative then transferred to new fixative (96% ethanol) and store at 4° C. Root tip were separated for slides preparation and to study the effect of colchicines and water extraction of harmala seeds on chromosome behaviour. Chromosomes were Stained by Giemsa stain then examined by using microscopic lens (100X).

The result of this study illustrated that chromosome behaviours was abnormal in samples that soaked in water extract of harmala seeds at concentration of (0.05%) ,therefore, chromosome stickiness and unfolding chromosome (in prophase), stickiness, Disturbed and chromosome breakage (in matephase), stickiness anaphase , deleting in some genetic material and multiple nucleuses (in tetophase) has detected ،also deformation in chromosome, change in position of the genetic material and deformation in morphological structure of divided cell were noticed. Treatment of peas seed by water extract of harmala seeds at concentration of (0.05%) caused improvements in plant growth parameters thus abundance of root and early formation in tendril and leaves were seen when it compared with controlled plant.

colchicines drug at concentration 0.05% affected plant growth however total of plant length reduced significantly also mutation as dwarfing, Rosseting and tumor has been noticed. In addition, deformation of cell and chromosome abnormality included chromosome stickiness and unfolding chromosome (in prophase), stickiness, Disturbed chromosome (in matephase), stickiness and chromosome bridge (in anaphase) , Micronucleus and multiple nucleuses (in tetophase) has detected.

It could be recommended that care should be taken when using such a drug also it should be discard plants that treated with colchicines and water extract of harmala seeds in especial scrap places .