التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami*

رافعة قادر جرجيس
كلية التربية

فادية موفق الحيالي
كلية العلوم

جامعة الموصل

تاريخ تسليم البحث : ٢٠١٠/٥/١٧ ؛ تاريخ قبول النشر : ٢٠١٠/١٠/٧

ملخص البحث :

تم اختبار التأثير التطفيري لأربعة تراكيز تحت سامة هي (١٠٠٠، ١٥٠٠، ٢٠٠٠، ٢٥٠٠) مايكروغرام/ مل من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل على كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami* باستخدام طريقتين، طريقة المعاملة المسبقة pretreatment method وطريقة النمو الوسيط growth mediated method .

أظهرت نتائج الطريقتين للتراكيز الأربعة المدروسة معدل تكرار الطفرات الجينية المستحثة بالمستخلص الكحولي والمقاومة للنظير 8-Azaadenin. وقد بين التحليل الإحصائي لنتائج الطريقتين باستخدام اختبار t عند مستوى احتمالية 0.05 وجود فروقات معنوية بين متوسط تكرار الطافرات المستحثة بالمستخلص مقارنة بالمعاملة السالبة (الطفرات التلقائية) وهذا يدل على وجود قدرة تطفيرية واضحة للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل على الفطر *A. amstelodami* .

Mutagenicity of alcoholic extract of Peganum harmala seeds in conidia of *Aspergillus amstelodami*

Girges R.K.
College of Education

Al-Hyaly, F. M
College of Science

University of Mosul

Abstract:

The mutagenicity effect of four sublethal concentrations of the alcoholic extract of *Peganum harmala* seeds including (1000, 1500, 2000, 2500) µg/ml in the conidia of the fungus *Aspergillus amstelodami* was

tested by using the two methods; pretreatment method and growth mediated method.

The results of the two methods using the four studied concentrations showed a percentage of repeated mutagenic genes induced by the alcoholic extract and the resistance to 8-Azaadenin. Statistical analysis of the two methods, using t-test at a probability rate of 0.05, showed a significant difference between the mean mutation frequency induced by the extract compared with the zero treatment (spontaneous mutation) this result suggests amutagenic effect of the alcoholic extract of *Peganum harmala* seeds in the fungus *A.amstelodami*.

المقدمة:

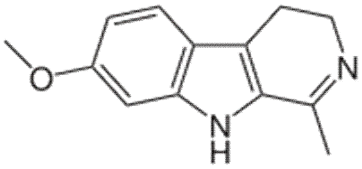
يعد الحرمل *Peganum harmala* من النباتات العشبية المعمرة، المنتشرة في شمال أفريقيا وغرب آسيا وجنوب شرق أوربا. ينتمي الحرمل إلى العائلة Zygophyllaceae وقد وضع مؤخراً ضمن عائلة Nitrariaceae (Goel,2009).

عرف الحرمل منذ القدم وجرى استخدامه في علاج العديد من الأمراض ولا يزال يستخدم حتى يومنا هذا كخافض للكلوكوز في المصل (Amare ,*et al*.,2008)، ونظراً لكون الحرمل مثبطاً لبعض وظائف الجهاز العصبي المركزي فقد استخدم مسكنا عاما للآلام Analgesic وعاملا مضادا للالتهابات Antiflammatory (Ali ,*et al.*,1995)، فضلا عن علاجه للكآبة والصرع وبعض الاضطرابات السلوكية الفسلجية (Monsef , *et al*.,2004).

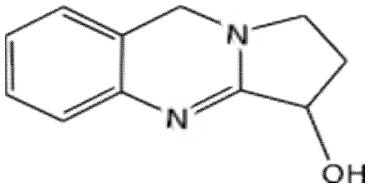
أشارت العديد من الدراسات إلى التنوع الكبير في خواص الحرمل الصيدلانية كونه مضاداً للعديد من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Arshad, *et al*.,2008) وخصوصاً البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية (Arshad , *et al*.,2008) فضلاً عن كونه مضاداً للعديد من الفطريات (Kanan & Najar, 2008). واستخدم أيضا طاردا وقاتلا للعديد من الطفيليات المعوية مثل الديدان والاوالي المقاومة للعقاقير الكيماوية، فضلاً عن استخدامه في علاج طفيلي الملاريا (Arshad , *et al*., 2008).

كما أشارت العديد من الدراسات إلى مسؤولية الحرمل عن حالات الإجهاض لدى الإناث الحوامل وانخفاض الخصوبة وإنتاج الحيامن لدى الذكور (El-Dwairi & Banihani,2007).

يحتوي الحرمل على العديد من المواد الفعالة صيدلانيا المعزولة من الجذور والبذور وهي عبارة عن أشباه القلويات مثل B-carbolin التي تشمل كلا من Harmane, Harmalol, Harmaline, Harmine وكذلك مشتقات Quinazoline مثل Vasicine, Vasicinone الشكل (١) (Massoud , *et al.*, 2002). وهذه القلويات تتركز في البذور الناضجة (Kamet , *et al.*, 1970).



Harmaline



Vasicine

الشكل (١) اثنان من المركبات العضوية المستخلصة من نبات الحرمل

استخدم B-carbolin مثبطا للأورام السرطانية Anticancer (Lamchouri, *et al.*, 2000) إذ سبب انخفاضا ملحوظا في الورم tumoural وبهذا عُد Antitumoural (., Zaker, *et al* 2007) وهذه الفعالية تعود إلى قدرة B-carbolin بشكل عام على تثبيط أنزيم DNA Topoisomerase الذي يلعب دورا حيويا في تضاعف DNA (Replication) وتكثيف الكروموسوم (condensation) وأستقرارية الجينوم (Malik & Nitiss , 2004)، لذا فقد اعتبرت هذه الأنزيمات هدفاً جيداً للمضادات الحيوية والمضادة للأورام ، إلا أن النتائج التي حصل عليها (Baeshin , *et al.*, 2008) تشير إلى امتلاك المستخلص المائي لأوراق نبات الحرمل تأثيراً مطفراً وقاتلاً للفطر *Aspergillus terreus* ونظراً لكون الحرمل من النباتات الواسعة الاستخدام في الطب الشعبي وبشكل خاص البذور فقد صممت هذه الدراسة للتقصي عن قدرة المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل على أحداث الطفرات الجينية في كونيدات الفطر *A. amstelodami*.

المواد وطرائق العمل

الكائن الاختباري:

جرت الدراسة باستخدام السلالة $A_1(wA_1)$ من الفطر *A. amstelodami* وهي سلالة ذات نمط بري بالنسبة لجميع الاحتياجات الغذائية ولكنها تحمل الطفرة التلقائية wA_1 التي حولت اللون الأخضر البري للكونيدات إلى اللون الأبيض (Caten, 1979). والتي تم الحصول عليها من الأستاذ الدكتور ساهي جواد ضاحي / جامعة الموصل / كلية العلوم / قسم علوم الحياة.

الأوساط الزرعية وظروف الزرع:

إن الأوساط الزرعية وظروف الزرع هي كما وصفها (Caten,1979) إذ استخدم وسطين أساسيين لأغراض النمو وهما كل من الوسط الأدنى غير المعضد Minimal medium (M) إذ أجريت جميع الاختبارات على هذا الوسط مضافاً إليه مواد الاختبار.

ووسط مستخلص الشعير – ملح الطعام Malt extract salt medium (MTS) ويستعمل هذا الوسط للحصول على اكبر عدد من الكونيدات. وللحصول على نمو سريع أضيف إلى الوسط الغذائي محلول الإضافة الكاملة Complete supplement (C) وبتركيز نهائي قدره ٥% (حجم/حجم) وللحصول على مستعمرات عديدة ومنفردة يسهل عدها أضيف إلى الوسط الغذائي الملح Sodium deoxycholate ويرمز له (D) وبتركيز نهائي قدره ٤٠٠ مايكرو غرام / مل من وسط النمو.

تحضير المحلول الخزين لنظير الأدنين 8-Azaadenine

تم تحضير محلول خزين للنظير 8-Azaadenine يحتوي على ٥٠٠٠ مايكروغرام / مل وذلك بإذابة ٠.٥غرام من النظير في اقل كمية ممكنة من IN NaOH ثم أكمل الحجم إلى ١٠٠ مل باستعمال الماء المقطر حسب طريقة (Hoffmann & Malling, 1974).

تحضير مستخلصات بذور الحرمل:

أولاً. جمع وتصنيف الحرمل : تم الحصول على بذور نبات الحرمل من الأسواق المحلية وبعد التأكد من تصنيفه في المعشب النباتي التابع لقسم علوم الحياة/ جامعة الموصل بعدها جرى تنظيف البذور من الشوائب والأتربة وحفظ في الثلاجة لحين البدء بتحضير المستخلصات.

ثانياً. حضر المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل باعتماد طريقة (Rios , *et al.*,1987) بعدها حضر منه محلول خزين بتركيز ٢٠٠ ملغم/ مل من الماء المقطر المعقم وعقم باستخدام مرشحات غشائية Millipore membrane ذات حجم ٠.٢٢ (النعمان،١٩٩٨).

ثالثاً. حضر المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل باعتماد طريقة (Grand ,*et al.*,1988) المحورة عن طريقة (Verpoorte , *et al.*,1982) . بعدها تمت إذابة 1 غرام من المستخلص الكحولي الجاف في ٥ مل من المذيب العضوي Dimethyl sulfoxide (DMSO) وعقم المستخلص بالبسترة عند درجة حرارة ٦٢°م ولمدة ٢٠ دقيقة (النعمان،١٩٩٨).

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جرى تحديد التركيز الأدنى المثبط للنمو **(MIC)** لكل من المستخلصات المائية والكحولية لبذور الحرمل باستخدام الوسط M الحاوي على تراكيز تصاعدية من المستخلصات ابتداء من الصفر الى ٦٠٠٠ مايكرو غرام/ مل وبإتباع طريقة الوخز Point Inoculation وذلك بعمل أربعة وخزات من السلالة A1 في كل طبق M المضاف إليه تركيز معين للمادة المدروسة وبعد أربع أيام من التحضين تم قياس أقطار المستعمرات النامية حول نقطة الوخز وجرى قياس أقطار المستعمرات والنسبة المئوية للتثبيط لكل تركيز.

تحضير العالق الكونيدي

حضر العالق الكونيدي للفطر *A. amstelodami* من مزرعة حديثة عمرها أربعة أيام منماة على الوسط CMTS وجرى تحديد تركيز العالق ب^{٧}١٠ كونيدة / مل باستخدام جهاز Haemocytometer .

عزل الطافرات وحساب تكرارها

تم عزل الطافرات التلقائية والمستحثة بالمستخلص الكحولي فقط المقاومة للنظير-8 Azaadenine وقد استعمل بتركيز ٥٠ مايكرو غرام / مل من وسط الزرع علماً أن التركيز ١٠ مايكرو غرام / مل من وسط النمو يعد كافياً لقتل السلالة الأبوية A_1 ، وتم حساب تكرار حدوث الطافرات على أساس عدد الكونيدات الحية في العالق الكونيدي (جرجيس، ١٩٩٩).

دراسة التأثير التطفيري:

جرى دراسة أربعة تراكيز متصاعدة من المستخلص الكحولي لبذور الحرمل وهي (١٠٠٠، ١٥٠٠، ٢٠٠٠، ٢٥٠٠) مايكرو غرام/ مل من الوسط ألزرعي وذلك بأتباع طريقتين:

١- طريقة المعاملة المسبقة Pretreatment method:

حضر عالق كونيدي ونقل إلى ٦ قناني معقمة ثم أضيف لأربع منها التراكيز السابقة من المستخلص الكحولي لبذور الحرمل مع مراعاة ترك القنينة الخامسة بدون معاملة حيث تمثل المعاملة التلقائية (معاملة الصفر) أو عينة السيطرة. تركت القناني الأربع لمدة ساعة مع مراعاة الرج المتكرر بعدها اخذ جزء من العالق الكونيدي لكل من المعاملات الخمس وجرى عزل الطافرات وحساب تكرارها(جرجيس، ١٩٩٩).

أما القنينة السادسة فكانت تمثل عينة السيطرة الموجبة إذ عوملت الكونيدات فيها بالمطفر الكيميائي حامض النتروز حسب طريقة (Azevedo,1970) للتأكد من قابلية السلالة A1 على الطفور عند معاملتها بمطفر معلوم.

٢- طريقة النمو الوسيط Growth mediated method:

في هذه الطريقة يتم تحضير أطباق حاوية على وسط MD مضافاً إليها التراكيز الأربعة المدروسة للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل، وروعي ترك بعض الأطباق MD بدون معاملة، بعدها لقحت تلك الأطباق بالعالق الكونيدي للسلالة A1 وبعد التحضين لمدة ٣ أيام بدرجة ٣٠°م جرفت الكونيدات من الأطباق الحاوية على التراكيز المدروسة وحضر العالق الكونيدي غير المخفف ١٠٠ لكل تركيز ويجري عزل الطفرات وحساب تكرارها كل على حده. كما حضر عالق كونيدي أخر من جرف كونيدات الأطباق MD وقسم إلى قسمين، الأول للعينة السالبة (المعاملة ٥)، الثاني لعينة السيطرة الموجبة باستخدام عامل مطفر (حامض النتروز). وكما في طريقة المعاملة المسبقة من حيث طريقة العمل وعزل الطافرات وحساب تكرارها.

٨. التحليل الإحصائي

جرى التحليل الإحصائي باستعمال باختبار t وتحت مستوى معنوية ٠.٠٥ (داؤد والياس، ١٩٩٠).

النتائج والمناقشة

التركيز الأدنى المثبط من المستخلصين المائي والكحولي لبذور الحرمل:

لدراسة التأثير التطفيري لأية مادة كيميائية على نمو أي كائن حي لأبد من معرفة التركيز الأدنى المثبط من تلك المادة على نمو ذلك الكائن (Brusick,1980) لذا جرى تتبع التأثير التثبيطي للتراكيز المتصاعدة من المستخلص المائي والكحولي اعتباراً من التركيز صفر إلى ٦٠٠٠ مايكروغرام/ مل من الوسط ألزرعي.

الجدول (١) : أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل (سم).

التركيز مايكروغرام/مل	المكررات				المتوسط	النسبة المؤوية للتثبيط %
	R1	R2	R3	R4		
٠	٢.٢٥	٢.٥	٢	٢.٢٥	٢.٢٥	–
١٠٠٠	٢	٢	٢.٢٥	٢.٥	٢.١	٢.٨٧
١٥٠٠	٢	٢	٢	٢	٢.٠٠	١١.١١
٢٠٠٠	٢	١.٨	١.٧	٢	١.٨٨	١٦.٤٤
٢٥٠٠	١.٥	١.٧٥	١.٦	١.٥	١.٥٩	٢٩.٣٣
٣٠٠٠	١.٥	١.٤	١.٥	١.٧	١.٥٣	٣٢.٠٠
٣٥٠٠	١.٤	١.٥	١.٣	١.٥	١.٤٣	٣٦.٤٤
٤٠٠٠	١.٣	١.٤	١.٣	١.٥	١.٣٨	٣٨.٦٧
٤٥٠٠	١.٣	١.٣	١.٢	١.٤	١.٣	٤٢.٢٢
٥٠٠٠	١.٣	١.٢	١.٣	١.٢	١.٢٥	٤٤.٤٤
٥٥٠٠	١.٢	١.٢	١.٢	١.١	١.١٨	٤٧.٥٦
٦٠٠٠	١	١.١	١.١	١.١	١.٠٨	٥٢.٢

يبين الجدول (١) أقطار مستعمرات الفطر التي أخذت بالتناقص التدريجي مع زيادة تركيز المستخلص المائي في وسط النمو إذ تراوحت النسبة المئوية للتثبيط بين ٢.٨٧% عند التركيز ١٠٠٠ مايكرو غرام/مل و ٥٢.٢% مع التركيز ٦٠٠٠ مايكرو غرام/ مل. يتبين من ذلك أن المستخلص المائي لبذور نبات الحرمل له تأثير تثبيطي ضعيف على نمو الفطر حتى عند تركيز ٦٠٠٠ مايكرو غرام/ مل.

تشير النتائج المبينة في الجدول (٢) الى أن التركيز المثبط الأدنى للمستخلص الكحولي أعطى نسبة تثبيط ٢٨.٠٩ % للتركيز ١٠٠٠ مايكرو غرام / مل، ارتفعت النسبة المئوية للتثبيط بزيادة التركيز إذ أعطى التركيز ٦٠٠٠ مايكرو غرام / مل نسبة تثبيط ٨٩.٣٦%، وهذا يتفق مع ما أشارت إليه العديد من الدراسات السابقة عن الفعالية المضادة للفطريات Antifungal لمستخلص نبات الحرمل المائية والكحولية والعلاقة الطردية بين نسبة القتل وتركيز المستخلص (Kanan & Najar, 2008).

الجدول (٢) : اقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل (سم).

التركيز مايكروغرام/مل	المكررات				المتوسط	النسبة المؤوية للتثبيط %
	R1	R2	R3	R4		
٠	٢.٤٥	٢.٣	٢.٣	٢.٣٥	٢.٣٥	–
١٠٠٠	١.٦	١.٥	٢	١.٦٥	١.٦٩	٢٨.٠٩
١٥٠٠	١.٦	١.٥	١.٥٥	١.٦٥	١.٥٧	٣٣.١٩
٢٠٠٠	١.٥	١.٥	١	١.٥	١.٣٨	٤١.٢٨
٢٥٠٠	١	١.٣	١.٣	١.٣٥	١.٢٤	٤٧.٣٤
٣٠٠٠	١.١	٠.٩	١.٣	١.٢	١.١٣	٥١.٩١
٣٥٠٠	١	١.١	١.٢	٠.٩	١.٠٥	٥٥.٣٢
٤٠٠٠	٠.٦٥	٠.٧	١	٠.٧	٠.٧٦	٦٧.٦٦
٤٥٠٠	٠.٥	٠.٥٥	٠.٦	٠.٤٥	٠.٥٣	٧٧.٤٥
٥٠٠٠	٠.٤٥	٠.٥	٠.٤٥	٠.٤	٠.٤٥	٨٠.٨٥
٥٥٠٠	٠.٣	٠.٤٥	٠.٢	٠.٣	٠.٣١	٨٧.٢٣
٦٠٠٠	٠.٣	٠.٣	٠.١	٠.٣	٠.٢٥	٨٩.٣٦

من النتائج السابقة نلاحظ أن المستخلص المائي أعطى تأثيراً تثبيطياً ضعيفاً للفطر مقارنتة بالمستخلص الكحولي لذا اقتصر البحث على دراسة التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي فقط، إذ تم اختيار التراكيز ألأربعة الاتية (١٠٠٠، ١٥٠٠، ٢٠٠٠، ٢٥٠٠) مايكروغرام/ مل بوصفها تراكيز تحت سامة (Sublethal) إذ أشار (McCann & Ames,1978) إلى أن التعبير عن الفعالية التطفيرية يحدث عند تركيز أقل من المستوى السام Toxic level لان المستوى السام يكون مصحوباً بتحطيم DNA.

التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل:

١. التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بطريقة المعاملة المسبقة

الجدول(٣):حجم العشيرة المتوقعة (×١٠^{٦}) وعدد الطافرات المقاومة للنظير 8-Azaadenin وتكرارها (×١٠$^{-٦}$) المشاهدة بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للحرمل بطريقة المعاملة المسبقة مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بحامض النتروز باعتباره مطفراً معلوماً.

تركيز المستخلص الكحولي للحرمل مايكروغرام / مل	R_1			R_2			R_3		
	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
٠	٢١.٠٠	٥٥	٢.٦٢	٢١.٠٠	٦٠	٢.٨٦	٢٠.٠٠	٥٧	٢.٨٥
١٠٠٠	١٨.٠٠	٨٠	٤.٤٤	١٨.٦٠	٧٥	٤.٠٣	١٩.٥٠	٦٢	٣.١٨
١٥٠٠	١٧.٨٠	٨٥	٤.٧٨	١٨.٠٠	٨٢	٤.٥٦	١٨.٣٠	٩٠	٤.٩٢
٢٠٠٠	١٧.٤٠	٩٣	٥.٣٥	١٧.١٠	٩٣	٥.٤٤	١٦.٧٧	٩٨	٥.٨٥
٢٥٠٠	١٦.٥٠	٩٠	٥.٤٥	١٦.٠٠	٩٦	٦.٠٠	١٥.٢٧	١٠٠	٦.٥٥
HNO2	١١.٤٦	٢٠٠	١٧.٤٥	١١.٤٦	٢٠٠	١٧.٤٥	٦.٦٧	١٢٥	١٨.٧٤

٠ : بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية. HNO2 :المعاملة بحامض النتروز(السيطرة الموجبة).

الجدول(٤):المقارنات الإحصائية باستخدام اختبارt لتكرار الطافرات(×10^{-6})المقاومة للنظير 8-Azaadenin والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بطريقة المعاملة المسبقة

تركيز المستخلص الكحولي لبذور الحرمل مايكروغرام / مل	المكررات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t المحسوبة
	R_1	R_2	R_3		
٠	٢.٦٢	٢.٨٦	٢.٨٥	٠.٠٧٨ ±٢.٧٧٨	
١٠٠٠	٤.٤٤	٤.٠٣	٣.١٨	٠.٣٧١ ± ٣.٨٨	٢.٩١
١٥٠٠	٤.٧٨	٤.٥٦	٤.٩٢	٠.١٠٥± ٤.٧٥	*١٥.١٠
٢٠٠٠	٥.٣٥	٥.٤٤	٥.٨٥	٠.١٥٤ ± ٥.٥٥	*١٦.٠٧
٢٥٠٠	٥.٤٥	٦	٦.٥٥	٠.٣١٨ ± ٦.٠٢	*٩.٩١
HNO2	١٧.٤٥	١٧.٤٥	١٨.٧٤	٠.٤٣ ±١٧.٨٨	*٣٤.٥٥

٠ : بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية. HNO2 : المعاملة بحامض النتروز(السيطرة الموجبة). * : معنوية عند مستوى احتمالية ٠.٠٥ .

t(4) : قيمة الاحصاء t لاربع درجات من درجات الحرية التي تقارن متوسط تكرار الطافرات لكل معاملة مع متوسطها من معاملة السيطرة السالبة

تبين النتائج الموضحة في الجدولين(٣-٤) قدرة المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل على تطفير كونيدات الفطر *A. amstelodami* إذ أعطت التراكيز الأربعة (١٠٠٠، ١٥٠٠، ٢٠٠٠، ٢٥٠٠) مايكروغرام/ مل معدلات لتكرار الطافرات المستحثة بالمستخلص الكحولي والمقاومة للنظير 8-Azaadenin تراوحت بين ٣.٨٨×١٠^{-٦} بالنسبة للتركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/مل إلى ٦.٠٢×١٠^{-٦} عند التركيز ٢٥٠٠ مايكروغرام/ مل وهي أعلى من معدل تكرار الطافرات التلقائية المقاومة للنظير8-Azaadenin والتي كانت ٠.٠٧٨×١٠^{-٦}، وقد أظهرت نتائج المقارنات الإحصائية باستخدام اختبار t عند مستوى احتمالية (٠.٠٥) وجود فروقات معنوية بين متوسط تكرارات الطافرات التلقائية والمستحثة إذ كانت قيمة t الجدولية ٤.٠٣٢ أقل من قيمتها المحسوبة.

٢. التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل بطريقة النمو الوسيط:

الجدول٥:حجم العشيرة المتوقعة ($\times ١٠^{٦}$) وعدد الطافرات المقاومة للنظير 8-Azaadenin وتكرارها ($\times ١٠^{-٦}$) المشاهدة بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للحرمل بطريقة النمو الوسيط مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بحامض النتروز باعتباره مطفراً معلوماً.

تركيز المستخلص الكحولي للحرمل مايكروغرام / مل	R_1			R_2			R_3		
	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
٠	١٨.٥٠	٢٥	١.٣٥	١٩.٤٦	٣٤	١.٧٥	١٦.٠٠	٤٥	٢.٨١
١٠٠٠	١٤.٦٦	٦٨	٤.٦٤	١٨.٥٣	٨٨	٤.٧٥	١٥.٠٠	٧٥	٥.٠٠
١٥٠٠	١٣.٤٠	٧٥	٥.٥٩	١٧.٦٠	٩٥	٥.٣٩	١٤.٠٠	٨٤	٦.٠٠
٢٠٠٠	١٢.٤٠	٧٧	٦.٢٠	١٦.٠٠	١٠٠	٦.٢٥	١٣.٢٠	٩٠	٦.٨٢
٢٥٠٠	١١.٢٠	٨٠	٧.١٤	١٥.٦٦	١٠٦	٦.٧٦	١٣.٠٠	٩١	٧.٠٠
HNO2	١١.٤٦	٢٠٠	١٧.٤٥	١١.٤٦	٢٠٠	١٧.٤٥	٦.٦٧	١٢٥	١٨.٧٤

٠ : بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية. HNO2 :المعاملة بحامض النتروز(السيطرة الموجبة).

الجدول ٦: المقارنات الاحصائية باستخدام اختبارt لتكرار الطافرات (× 10^{-6}) المقاومة للنظير-8 Azaadenin والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي لبذور الحرمل بطريقة النمو الوسيط

تركيز المستخلص الكحولي لبذور الحرمل مايكروغرام / مل	المكررات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t المحسوبة
	R_1	R_2	R_3		
٠	١.٣٥	١.٧٥	٢.٨١	٠.٤٣٦± ١.٩٧	
١٠٠٠	٤.٦٤	٤.٧٥	٥	٠.١٠٧± ٤.٨١	*٦.٣٣
١٥٠٠	٥.٥٩	٥.٣٩	٦	٠.١٨± ٥.٦٦	*٧.٨٢
٢٠٠٠	٦.٢	٦.٢٥	٦.٨٢	٠.١٩٩± ٦.٤٢	*٩.٣٠
٢٥٠٠	٧.١٤	٦.٧٦	٧	٠.١١٢± ٦.٩٧	*١١.١١
HNO2	١٧.٤٥	١٧.٤٥	١٨.٧٤	٠.٤٣±١٧.٨٨	*٣٤.٥٥

٠ : بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية. HNO : المعاملة بحامض النتروز (السيطرة الموجبة). *
: معنوية عند مستوى احتمالية ٠.٠٥

t(4): قيمة الاحصاء t لاربع درجات من درجات الحرية التي تقارن متوسط تكرار الطافرات لكل معاملة مع متوسطها من معاملة السيطرة السالبة

تشير النتائج الموضحة في الجدولين (٥-٦) الى امتلاك المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل قدرة تطفيرية على كونيدات الفطر *A. amstelodami* إذ أظهرت التراكيز الأربعة المدروسة للمستخلص معدل تكرار الطافرات المستحثة المقاومة للعقار8-Azaadenin وهي ($^{-٦}$ ١٠ × ٤.٨١ ، $^{-٦}$١٠ × ٥.٦٦، $^{-٦}$١٠ × ٦.٤٢، $^{-٦}$١٠ × ٦.٩٧) على الترتيب وهذه النسب أعلى بكثير من معدل تكرار الطافرات التلقائية $^{-٦}$١٠ × ١.٩٧ . ومن خلال المقارنة الإحصائية بين متوسط تكرار الطافرات التلقائية والمستحثة بالمستخلص تبين وجود فروقات معنوية وكما موضح في الجدول(٦).

ومن النتائج السابقة نلاحظ أن معدل تكرار الطافرات يزداد تدريجيا مع زيادة تركيز المستخلص الكحولي لبذور الحرمل وهذا يتفق مع نتائج (الهاشمي، ٢٠٠٥ ; Masuda, *et al.*,2005). كما أظهرت مقارنة بين متوسط تكرار الطافرات التلقائية المقاومة للنظير -8 Azaadenin والمستحثة بالمطفر الكيميائي حامض النتروز (عينة موجبة) وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ٠.٠٥ إذ كانت قيمة t4 المحسوبة لأربع درجات حرية ٢٥.٩٩ وهي أكبر من قيمة t الجدولية التي بلغت (٤.٠٣٢)، وهذا يدل على أن السلالة A1 من الفطر *A..amstelodami*هي سلالة قابلة للطفور وتستجيب للتأثير التطفيري بحامض النتروز.

ومما سبق نلاحظ أن معدل تكرار الطافرات المستحثة بالمستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل المقاومة للنظير 8-Azaadenin بطريقة النمو الوسيط كانت أعلى من معدل تكرار الطافرات المستحثة المقاومة للنظير 8-Azaadenin بطريقة المعاملة المسبقة وهذا يعود إلى أن طريقة النمو الوسيط تزرع كونيدات الفطر على الوسط الكامل CMD مضافا إليه التراكيز الأربعة المدروسة للمستخلص النباتي وتحضن لمدة أربعة أيام وهذه الفترة تعد كافية للفطر لإجراء العمليات الايضية على المستخلص في أثناء نمو الغزل الفطري محولا المستخلص إلى مركبات وسيطة أو مركبات نهائية جديدة أدت إلى زيادة في معدل الطفور، ومن ناحية ثانية فان المادة الوراثية التي تكون في حالة تضاعف (في النوى المنقسمة) تكون أكثر حساسية للعوامل المطفرة، كما أن التطفير من خلال النمو الوسيط يهيئ الفرصة للنوى الطافرة لكي تتقاسم وتتكاثر في غياب المادة الانتقائية 8-Azaadenin أي انه يعمل على تضخيم التأثير التطفيري للعامل المطفر مما يزيد عدد الطافرات ويساعد على اكتشافها حتى وان كان المطفر المدروس ضعيفاً (Kafer , *et al.*, 1986).

تظهر النتائج الموضحة في (الجدول 4 ، 6) امتلاك المستخلص الكحولي لبذور نبات الحرمل قدرة تطفيرية في كونيدات الفطر *A. amstelodami* وهذا يتفق مع نتائج (Masuda, *et al.*,2005). كما أشارت العديد من الدراسات إلى دور B-carbolin في تثبيط أنزيم DNA topoisomerase I (Sobhani, *et al.*, 2002) والذي يلعب دوراً حيوياً في إزالة الحلزنة الفائقة وهي مرحلة مهمة تسبق عمليتي تضاعف واستنساخ الـ DNA (Malik & Nitiss, 2004) وعليه فقد يؤدي نقصان هذا الأنزيم إلى حدوث عطب في DNA الخلية تعجز آليات الإصلاح DNA repair mechanisms عن إصلاحه مما يؤدي إلى نشوء الطفرة. وعليه فان النتائج التي تم الحصول عليها من هذا البحث تبين وجود قدرة تطفيرية للمستخلص الكحولي لبذور الحرمل مما يشير إلى احتمالية كون بذور الحرمل مسرطنة لخلايا الكائنات حقيقية النواة ومنها الإنسان.

المصادر العربية:

١. جرجيس، رافعة قادر (١٩٩٩). التأثير التطفيري للترابسورالين والأشعة فوق البنفسجية القريبة في الفطر *Aspergillus amstelodami* . أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

٢. داؤد، خالد محمد و اليأس، زكي عبد (١٩٩٠). الطرق الإحصائية للأبحاث الزراعية، مطابع التعليم العالي، الموصل، العراق.

٣. النعمان، أديبة يونس شريف حمو (١٩٩٨). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وايض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

٤. الهاشمي، علوية بنت محمد صالح (٢٠٠٥). تقيم السمية الوراثية لمستخلص أوراق نبات الحرمل باستخدام اختبار طفرات العوز الغذائي في خميرة الخبز. رسالة ماجستير .جامعة الملك عبد العزيز. المملكة العربية السعودية.

المصادر الأجنبية:

1. Ali, B.H., Bashir, A.H.; Tanira, M.O. and Banna, S.(1995). Some nervous system actions of Rhazya stricta in mice. *Cln. Exp. Pharmacol. Physiol*., 20, 496-502.
2. Amar B.; singh, J.P.; chaturvedi, T.; narender and arvind K. S. (2008). Preliminary studies on the hypoglycemic effect of peganum harmala l. Seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Ind. j. clinic.biochem.*, 23 (4), 391-393.
3. 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.
4. Arshad, N.;Neubauer, C.; Hasnain, S.; Hess, M. (2008). *Peganum harmala* can minimize *Escherichia coli* infection in poultry, but long-term feeding may induce side effects. *Poult.Sci*., 87(2), 240-9.
5. Azevedo, J. L. (1970) Recessive lethal induced by nitrous acid in *Aspergillus nidulans* .*Mutat. Res.*, 10, 11-117 .

6. 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. Mutat. Res.*
7. Brusick, D. (1980). "Principles of Genetics Toxicology". Plenum Press, London.
8. Caten, C. E., (1979). Genetic determination of conidial color in *Aspergillus* hetero-caryoticus and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami*. *Trans. Bri. Mycol. Soc*., 73, 65-74.
9. El-Dwairi Q. A. and Banihani S. M. (2007). Histo-functional effects of *Peganum harmala* on male rat's spermatogenesis and fertility. *Neuro Endocrinal Lett*., 28 (3), 305-310.
10. Goel, N.; Singh, N.; Sai, R.(2009). Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmala L*.) using 6-benzylaminopurine pre-conditioned seedling explants. *Nat. Sci*., 7(7).
11. Grand, A. ; Wondergem, P. A. ; Verpoorte, R. and Pousset, J. L. (1988). Anti-infections phytotherapies of the tree Savannah of Senegal (West – Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. *J. Ethnopharmacol.*, 22, 25 – 31.
12. Hoffman, G. R. and Malling, H. V.(1974). Mutants of Neurospora crassa resistant to 8-azaguananine. *H. Gen. Microbiol*., 83, 319-326.
13. Kafer, E. ; Scott, B. R. and Kappas, A. (1986). Systems and results of tests for chemical induction of mitotic maisegregation and anenpolidu in *Aspergillus nidulans. Mutat. Res*., 167, 9-34.
14. Kamet,S.;Ibrahin,L.;Afifi,A.andHamza,S.(1970).Major alkaloidal constituents of the Egyptia plant *Peganum harmala. U.A.R.J. Vet. Sci*., 7, 71-86.
15. Kanan, G.J.; Al-Najar,R.A. (2008). *In vitro* Antifungal Activities of Various Plant Crude Extracts and Fractions Against Citrus post-harvest Disease Agent *Penicillium digitatum, J.J.B.S.*, 1(3), 89 – 99 .

16. Lamchouri, F.; Settaf, A.; Cherrah ,Y.; Hassar, M.; Zemzami, M.; Atif, N.; Nadori, E. B.; Zaid ,A.; Lyoussi ,B. (2000). In vitro cell-toxicity of *Peganum harmala* alkaloids on cancerous cell-lines. *Fitoterapie.*,71(1), 50-4.
17. Malik M.and Nitiss J. L. (2004) DNA Repair Functions That Control Sensitivity to Topoisomerase-Targeting Drugs . *A.S.M.*, 3(1), 82-90 .
18. Masuda, S. ; Kanamori, H. ; Kinae, N. (2005). Isolation of Mutagenic β-Carboline Derivatives after Nitrite Treatment of Maillard Reaction Mixtures and Analysis of These Compounds from Food stuffs and Human Urine. *Biosci.. Biotechno. Biochem.*, 69 (11), 2232-2235.
19. McCann, J. and Ames, B. N. (1978). The Salmonella microsome mutagenicity test : Predictive value for animal carcinogenicity. In: W. G. Flamm and M. A. Mehlman (eds.). Mutagenesis. Hemisphere Publishing Corporation, Washington. PP. 87 – 108.
20. Monsef, H. R.; Ghobadi,A.; Iranshahi ,M.; Abdollahi,M. (2004). Antinociceptive effects of *Peganum harmala L.* alkaloid extract on mouse formalin test.J *Pharmaceut Sci .*, 7(1), 65-69.
21. Riose, J. L. ; Recio, M. C. and Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *J. Ethnopharmacol*., 21, 139 – 152.
22. Sobhani, A. M.; Ebrahimi, S. A.; Mahmoudian, M.(2002). An *in vitro* evaluation of human DNA topoisomerase I inhibition by *Peganum harmala* L. seeds extract and its beta carboline alkaloid. *J .Pharmacy and Pharmaceut. Sci*., 5, 19-23.
23. Verpoorte, R. ; Tginastoi, A. ; Vandoorm, H. and Svendsen, A. B. (1982). Medical plant of Serinam, L-Antimicrobial activity and some medicinal plant. *J. Ethnopharmaco.*, 5, 221 – 226.
24. Zaker, F. Oody, A.; Arjmand, A. (2007). A Study on the Antitumoral and Differentiation Effectsof *Peganum harmala* Derivatives in Combination with ATRAon Leukaemic Cells, *Arch Pharm Res*., 30 (7), 844-849.