African Journal of Advanced Pure and Applied Sciences (AJAPAS)

Online ISSN: 2957-644X

Volume 3, Issue 1, January-March 2024, Page No: 20-29

Website: *https://aaasjournals.com/index.php/ajapas/index*

معامل التأثير العربي 2023: (1.55) SJIFactor 2023: 5.689 ISI 2022-2023: 0.557

التأثيرات السيتووراثية لنوعين من نبات الروبيا (*Marrubium* sp) على المادة الوراثية لخلايا البصل (*Allium cepa*_L.) المنقسمة

فوزية مفتاح حمد الجازوي [1 *]، سميرة فرج محمد بوحجر [2]، فوزية رجب القربولي [3]

[2،1] قسم النبات، جامعة بنغازي، بنغازي، ليبيا

[3] قسم الوراثة، جامعة مصراتة، مصراتة، ليبيا

[*] *Corresponding author: fawzia.aljazwia@uob.edu.ly*

Received: November 02, 2023	Accepted: December 27, 2023	Published: January 12, 2024

الملخص

تهدف هذه الدراسة لبحث السمية الخلوية لمستخلصات مائية لنوعين من نبات الروبيا هما *Marrubium alysson*, *Marrubium vulgare* استخدم نبات البصل *Allium Cepa* L. لفاعليته كنظام حيوي لقياس الانحرافات الصبغية، حيث عوملت الخلايا النامية لقمم الجذور. بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي (التخفيف الثاني 10^{-3}، التخفيف الأول 10^{-1} والمستخلص الخام) ولفترات زمنية مختلفة (4، 12 و24 ساعة)، تم دراسة التغيرات في معدل الانقسام الفتيلي، سلوك الصبغيات أثناء الانقسام وكمية DNA في الخلايا المعاملة، أظهرت النتائج المتحصل عليها إن كل المستخلصات المائية لنبات الروبيا لها القدرة على إحداث التغيرات في الانقسام الخلوي بدرجات متقاربة وذلك بتخفيض معدل الانقسام، إنتاج عدد كبير من الانحرافات في سلوك الصبغيات وكذلك تغيرات الزيادة والنقصان في كميات الحامض النووي DNA. هذه التغيرات اعتمدت على التركيز وزمن المعاملة. صنفت أنواع الانحرافات في سلوك الصبغيات إلى نوعين هما الطفرات الفسيولوجية وكانت أكثرها شيوعاً والمتمثلة في (التكثيف المبكر لصبغيات الطور التمهيدي، التصاق الصبغيات، الصبغيات المبعثرة في الطور الاستوائي، تعدد الأقطاب والصبغي المتأخر) والطفرات الجينية والمتمثلة في (الجسور الصبغية في الطور الانفصالي والنهائي، تكسير الصبغيات وتكوين الأنوية الصغيرة). الزيادة في كميات الحامض النووي DNA عللت كنتيجة لتراكم الخلايا في مرحلة G2 ومنع مرورها. إلى مرحلة M يفسر الانخفاض في معدل الانقسام الفتيلي (MI).

الكلمات المفتاحية: نبات الروبيا، الانحرافات الصبغية، معدل الانقسام.

Cytogenetic Effect of two species of Rubia plant (*Marrubium* sp) on genetic material of the dividing onion (*Allium cepa* L.) Cells

Fawzia Muftah Hamed AlJazwia[1 *], Samira Farag Mohamed Bo Hagar[2], Fauzia Rajab ElGarbulli [3]

[1,2] Department of Botany, Benghazi University, Benghazi, Libya.

[3] Department of Genetics, Misurata University, Misurata, Libya.

Abstract

The object of this study is to investigate the cytotoxicity for aqueous extracts of two species of rubia plant (*Marrubium vulgare* & *Marrubium alysson*) using onion plant (*Allium cepa* L.) as regards its efficiency as a bioassay to measuring chromosome aberrations. Which it was the growing root tip cells were treated with different concentrations of aqueous extract (stock,10-1,10-3) with control for different exposure times (4, 12, 24 hours). We focused on the changes in mitotic index, mitotic chromosomal behaviour and the amount of DNA in treated cells. The obtained results indicate that all aqueous extracts of rubia plant can cause different mitotic changes with approximate degrees of reduction in mitotic index, changes in DNA amount and production of a large number of mitotic abnormalities. These changes depend on concentration and duration of treatment. The obtained abnormalities were grouped in two classes – physiological and clastogenic. The physiological class was the most common one, which included: early condensation, stickiness in chromosomes, C-metaphase, multipolar and laggards and clastogenic class including bridges, chromosome fragmentation and micronucleus. The increase in DNA amount in treated samples is suggested to be a result of the accumulation of treated cells in G2 phase. And blocking them from reaching M phase explains the inhibition of the mitotic index (MI).

Keywords: Rubia Plant, Chromosome Aberrations, Mitotic Index.

1. مقدمة

اهتم البحث العلمي في السنوات الأخيرة إلي الوصول لمواد آمنة لعلاج أمراض الإنسان والحيوان بعيداً عن الكيمياويات المختلفة ونظراً لأهمية النباتات الطبية والعطرية والأعشاب يعتمد حوالي 80% من سكان الدول النامية علي

النبات الطبي التقليدي لحاجات رعايتهم الصحية الأساسية [34]. لذلك بدئوا العديد من العلماء في التفكير للعودة إلى هذه المصادر الحيوية لتصنيع الأدوية، حيث أنها أكثر آمنا وسلامة وهذا ما أكده المؤتمر الرابع عشر لعلماء النبات المنعقد في برلين الغربية في عام1987، الذي أوصي بالتركيز علي ضرورة زيادة الاهتمام بالنباتات الطبية والمحافظة عليها من الانقراض [1]. حيث يستخرج منها المواد العلاجية لأمراض عجز الطب الكيميائي عن معالجتها ومواجهتها [2]، والآن حوالي 25% من الأدوية الموصوفة في العالم تنشأ من النباتات[24] . ولكن اغلب النباتات الطبية تتكون من مواد سامة تعمل في الطبيعة كدفاعات ضد الإصابات الميكروبية والحشرات وآكلة النباتات وبالتالي ممكن أن تؤثر علي الإنسان فيما بعد، وهكذا من الضروري تقييم السمية الخلوية و المطفرة لضمان استخدام آمن لهذه النباتات [30] . وقد قامت العديد من الدراسات والبحوث لمعرفة تأثيرها علي نشاط الخلايا والمادة الوراثية ومدي آثارها السلبية، منها [34,30, 26]، ورشحت العديد من الدراسات الاختبار الحيوي لنبات البصل *Allium cepa* L. كاختبار فعال لكشف تأثير المواد السامة وراثيا لتشابه صبغياته بصبغيات الإنسان ومنها [6].

نبات الروبيا من النباتات العشبية المعمرة موطنها الأصلي أوروبا واسيا وشمال إفريقيا ينتمي هذا الجنس إلى العائلة الشفوية Lamiaceae ويحتوي على35 نوع يوجد منها في ليبيا 3 أنواع فقط هي: *M.Vulgare* و *M.alysson* و *M.deserti* (simon وآخرون ،1984)ينمو في الأراضي الجافة والمهجورة والصخرية والمشمسة والتي تكثر فيها المواد الذبالية [1]. الشكل الخارجي للنوعين *M.Vulgare* و *M.alysson* متشابه ولكن التمييز بينهما في عدد سبلات الكأس ولون الأزهار(الشكل 1) حيث إن النبات *M.Vulgare* فيه عدد السبلات 10 وأزهاره بيضاء اللون، أما *M alysson* فعدد السبلات 5 ذات أشواك وأزهاره بنفسجية اللون.

استعمل نبات الروبيا كاحد الأعشاب المستخدمة بكثرة في الطب الشعبي في العديد من أنحاء العالم، كمنقوع أو مغلي الأجزاء الخضرية بالكامل (أوراق والسيقان) ويحتوي على المركبات التالية : حامض البورسوليك ، التانين ، الموربين ، الراتنج، الكولين و السيترول، كذلك مواد صابونية وزيوت طيارة [3]. استعمل نبات *M Vulgare* في الطب ضد الربو والسعال والبرد والتهابات القصبة الهوائية والحنجرة وتهيج الجلد وكمنبه ومسهل ومقوي ومدر ولمعالجة الأورام إما زيته الطيار يستعمل كطارد للغازات ومقشع [29]. إن الخواص العلاجية لهذا النبات (كمقشع- كمنظم لنبضات القلب) تنسب إلى التربينMarrubiin والتربينات الثنائي الأخرى [35]. ويستخدم كذلك في ليبيا لدى الكثير من العشابين في محلات العطار دون التمييز بين نوعيه ودون دراية بمحتوياته أو ما قد يسببه من أضرار بالإضافة إلي منافعه، ومن استخداماته أيضا كمضاد ميكروبي مما يحتمل خطورته حيث لم تتواجد دراسات حول هذه النبات تكشف ما مدي السمية الجينية له.

هذه الدراسة تهدف للبحث عن مدي التأثير الطافر أو السمية علي المادة الوراثية وسلوك الصبغيات لنوعين من هذا النبات واستخدمت القمم النامية لجذور نبات البصل الذي استخدم حديثا لكشف مثل هذه الدراسات للعديد من الأعشاب الطبية والملوثات .

أ ب

الشكل (1): (أ) نبات الروبيا نوع *Marrubium vulgare L.* ذات الأزهار البيضاء. (ب) نبات الروبيا نوع *Marrubium alysson L.* ذات الأزهار البنفسجية.

2. المواد وطرق البحث

1.2. المواد وتحضير المستخلص الخام:

في هذه الدراسة استخدمت الأجزاء الخضرية لنوعين من نبات الروبيا التي تنتمي للعائلة الشفوية هما: *Marrubium vulgare* حيث تم تجميعه في مرحلة الإزهار من منطقة الباكور في الفترة بين ابريل – يوليو و

Marrubium alysson حيث تم تجميعه من منطقة بنينا في الفترة من يناير – أبريل بعد التصنيف حسب كتاب الفلورا الليبية ، نُظِفت النباتات وجُفِفت طبيعياً عن طريق تعريضها للهواء في الظل حتى لا تتأثر مكوناتها الفعالة. حُضِرَ المستخلص الخام بأخذ وزن 60جرام من النبات في 350 مل من الماء المقطر عن طريق جهاز الاستخلاص بالبخار والتكثيف عند درجة حرارة 90 درجة مئوية لمدة 3 دورات كاملة حيث تستغرق الدورة 15دقيقة [11] استخدم المحلول الخام (stock) للعصارة لتحضير تخفيفين (10^{-1} و10^{-3}).

2.2. تقنية تحضير الصبغيات النباتية

أُستخدم في هذه الدراسة بذور نبات البصل (*Allium cepa* L.) صنف Texas Grano 502 مستورد من شركة(PRR Enkhuizen) الهولندية. تم إنبات بذور البصل في أطباق بتري تحتوي على أوراق ترشيح مبللة بالماء المقطر ووضعت في مكان مظلم عند درجة حرارة 20 ± 2 مْ لمدة 3 - 5 أيام مع مراعاة تجديد الماء يومياً وبعد وصول طول الجذير 0.5-1 سم عوملت البذور المنبتة بالتراكيز المختلفة من المستخلص النباتي لنوعين من جنس ***Marrubium*** المستخدمة في هذه الدراسة باستثناء الضابط (control) الذي استمر معاملته بالماء المقطر ، ثم جمعت العينات بعد زمن (4، 12، 24 ساعة) من المعاملة. جُهزت الشرائح بأخذ العينات والتثبيت في محلول [3حجم إيثانول :1 حجم حمض الخليك الثلجي] لمدة 12 ساعة بعد التثبيت خزنت العينات في محلول إيثانول بتركيز 70% في مكان بارد لغرض الحفظ لحين الخطوة التالية. تم التحليل المائي باستخدم 1N- HCl للعينات لمدة 12 دقيقة عند درجة حرارة 60ْم ثم صبغت العينات بصبغة الاسيتوكارمن aceto-carmine لمدة ساعة ، غسلت بعدها بمحلول حمض الخليك الثلجي45 % ، بعد ذلك قطعت القمم المرستيمية للجذور وسحقت على الشريحة الزجاجية . فحصت 3 شرائح لكل معاملة بواسطة المجهر الضوئي تحت العدسة (×40) وسجل عدد الخلايا المنقسمة وعدد الخلايا الكلي وعدد الخلايا الطافرة لتقدير وحساب معدل الانقسام MI (Mitotic index) وكذلك نسبة الطفرات في الخلايا المنقسمة [27] .

حساب معدل الإنقسام = عدد الخلايا المنقسمة/عدد الخلايا الكلي × 100

حساب نسبة الطفرات = عدد الخلايا الطافرة/عدد الخلايا المنقسمة × 100

3.2. تقنية استخلاص الحامض النووي DNA :-

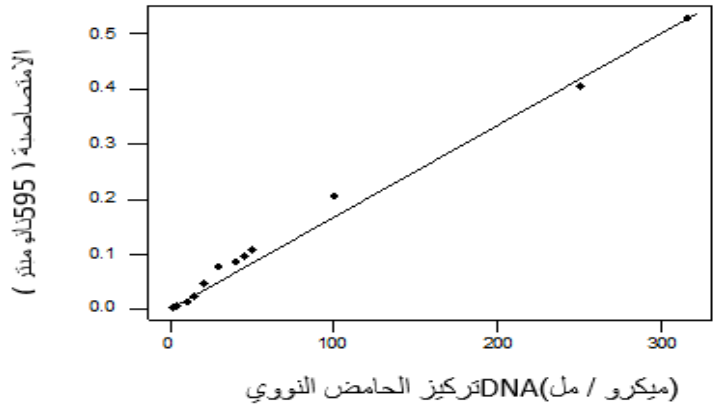
أُستخدم في هذه التقنية أبصال نبات البصل متقاربة في الحجم وملائمة لحجم الكؤوس الزجاجية المستخدمة في عملية الإنبات حيث تم تنظيفها ونزع القشور الخارجية الجافة وكذلك الجذور الجافة النامية قبل عملية الزراعة، بعد ذلك غمرت ساق البصل القرصية داخل الكؤوس المملؤة بالماء المقطر، مع مراعاة تغيير الماء يومياً ، في درجة حرارة الغرفة(20 - 25ْم) انبتت الجذور إلى طول 1- 2 سم . في الخطوة التالية أستبدل الماء المقطر بالتراكيز المختلفة للمستخلص النباتي (10^{-1} ،10^{-3} ، والخام) باستثناء الضابط الذي استمر معاملته بالماء المقطر ثم جمعت العينات بعد أزمنة مختلفة من المعاملة وهي (4, 12 ,24 ساعة). قطعت قمم الجذور بطول 1-1.5 سم ووضعت على أوراق ترشيح للتخلص من بقايا تخفيفات المستخلص النباتي وبعد ذلك تم وزن 0.5 جرام لكل معاملة ووضعت في المجمد عند درجة حرارة (-20ْم).

استخلص الحامض النووي DNA بطريقة Badr (1986) [8]). حيث سُحِقت قمم الجذور المجمدة في الهاون في وجود رمل زجاجي معقم مع 4 مل من محلول (Tris-EDTATris + 0.1 M NaCl + 0.1 EDTA,pH=8 0.05 M) ثم الخلط مع 1 مل منSDS (sodium dodecyl sulphate) و1 مل من ملح السترات القياسي SSC (0.0015M Tris sodium citrate +0.015M Nacl, pH=7) ولإزالة البروتينات والدهون والأجزاء النباتية الأخرى خلط محلول DNA مع 4 مل من محلول خليط من الكلوروفورم وكحول isoamyl بحجم 1:24 على التوالي ثم وضعت بحذر في أنابيب اختبار متساوية في جهاز الطرد المركزي HERMLE centrifuge Z320, F. R. (BHG Germany)عند 4000 دورة لكل دقيقة لمدة 20 دقيقة. قدر تركيز الحامض النووي بخلط 1مل من المادة الطافية في أنابيب الاختبار السابقة مع 1مل من محلول 30% حامض البيركلوريك وكذلك 6 مل من كاشف بيرتن Burton 3جم صبغة ثنائي فنيل أمين + 200 مل حمض الخليك + 1 مل حمض الكبريتيك المركز + 1مل من1.6% اسيتالدهيد) ثم حفظ الخليط في الحاضنة عند 30ْم لمدة 19 ساعة ، مع مراعاة إن جميع خطوات هذه التجربة كانت في أحواض من الثلج المجروش وأدوات معقمة ومبردة وكذلك جهز تكرارين لكل معاملة. بعد التحضين، قيست الكثافة البصرية للمحلول باستخدام جهاز المطياف الضوئي (JENWAY 6300 spectrophotometer) عند الطول الموجي595 نانوميتر وحسبت بعد ذلك كمية الحامض النووي DNA من المنحنى القياسي لعينات الحامض النووي DNA المستخلص من قمم نبات البصل المعلومة التراكيز حصلنا عليها من معمل هندسة الجينات (مركز بحوث التقنيات الحيوية ، طرابلس ، ليبيا) ثم خلطت هذه التراكيز بكاشف بيرتن (Burton) وقيس تركيز الحامض النووي والامتصاصية عند 595 نانوميتر لكل منهما.

4.2. التحليل الإحصائي:

اجري التحليل الإحصائي لبيانات هذه الدراسة (معدل الانقسام، نسبة الطفرات، كمية الحامض النووي DNA) باستخدام البرنامج SPSS. لحساب الفروق المعنوية باستخدام تحليل التباين في اتجاهين ((2-way ANOVA بمستوى

معنوية ($P < 0.05$). ورسم المنحنى القياسي عن طريق البرنامج الإحصائي Minitab بتحليل الانحدار بين التركيز والامتصاصية لعينات الحامض النووي (الشكل 2).



الشكل (2): المنحنى القياسي للتركيز بدلالة الامتصاصية

3. النتائج والمناقشة

1.3. تأثير مستخلص نبات *M. Vulgare* ونبات *M. alysson* على معدل الانقسام:

في هذا البحث استخدمت الخلايا القمية لجذور نبات البصل *Allium cepa L.* لدراسة السمية الجينية لنوعين من نبات الروبيا *Marrubium* حيث أستخدمت بصورة مستخلصات مائية بتراكيز مختلفة (التخفيف الثاني 10^{-3}، التخفيف الأول 10^{-1} والمستخلص الخام) ولفترات زمنية مختلفة (4، 12 و24 ساعة) وقورنت بالضابط. أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1)، أن المستخلص النباتي لكلا النباتين (*M Vulgare* و *M alysson*) له تأثير معنوي مثبط لمعدل الانقسام الخلوي (MI) في خلايا البصل المعاملة مقارنة بالضابط في جميع التراكيز و أوقات التعرض المختلفة، حيث يزداد التثبيط بزيادة التركيز وزمن المعالجة وهذه النتائج متشابهة لنتائج دراسات سابقة لدراسة السمية الجينية لمستخلصات بعض النباتات ومواد كيميائية [4, 20, 6].

ففي الفترة الزمنية القصيرة من التعرض (4 ساعات) كان هناك نقص في قيم معدل الانقسام الخلوي في الخلايا المعاملة بزيادة التركيز لمستخلص نوعي نبات الروبيا، التخفيف الثاني (10^{-3}) ، التخفيف الأول (10^{-1}) والمستخلص الخام مقارنة بالضابط. وبزيادة الزمن إلى 12 ساعة حدث تناقص أكبر في معدل الانقسام الخلوي مقارنة بالضابط. وعند الفترة الزمنية 24 ساعة وزيادة التركيز كان النقص في معدل الانقسام معنوي بالمقارنة بكل الازمن (4 و 12 ساعة) وأيضًا بمقارنته بالضابط (الجدول 1). وهذا يتفق أيضاً مع ما وجده Kumar و Panneerselvam في عام 2007 [20] أثناء دراسة السمية الخلوية لحافظ الغذاء potassium metabisulphite على الخلايا القمية لجذور نبات البصل *Allium cepa L* إن معدل الانقسام ينقص في الخلايا المعاملة بالمادة مقارنة بالضابط و إن النسبة المئوية لمعدل الانقسام تنخفض بازدياد الجرعة و الوقت.

في هذه الدراسة لوحظ أن التركيز العالي (الخام) لمستخلص نبات الروبيا كان أكبر مثبط للانقسام الخلوي (MI=0) في جميع الفترات الزمنية أي أن تأثيره لا يعتمد على الزمن وان هذا المستخلص يحتوي على تراكيز عالية لمثبطات الانقسام Antimitotic agents. وهذا يتفق مع ما وجده Saggoo وآخرون 1991[26] في التراكيز العالية من مستخلص أوراق نبات *Tylophora indica L.* التي أدت إلي نقصان في معدل الانقسام للخلايا المرستيمية في نبات البصل مقارنة بالضابط بسبب امتداد أو استطالة مرحلة S و إضعاف الخلايا في مرحلة G_1 ومنع دخولها مرحلة S.

هذا التثبيط في معدل الانقسام ممكن أن يرجع إلي تثبيط تخليق الحامض النووي DNA [4 , 32]. حيث وجد الجازوي في عام 2009 [4] التأثيرات السيتوراثية لنبات الفيجل *Ruta chalepensis* علي الخلايا المنقسمة لنبات البصل وعلل الانخفاض في معدل الانقسام عند المعاملة بالتركيز العالي 20 ملجم/ مل دليل علي تثبيط وإيقاف التضاعف في المادة الوراثية.

إن العديد من الدراسات تعزي سبب النقص في قيمة معدل الانقسام الفتيلي MI إلى تكسير المادة الوراثية في الخلايا المنقسمة [14]. كذلك إيقاف الخلايا في مرحلة G_2 من الدورة الخلوية ومنعها من الدخول إلى مرحلة M بسبب حدوث الطفرات بها يؤدي إلى نقص وانخفاض في معدل الانقسام الفتيلي [17] بالإضافة إلى إن انخفاض معدل الانقسام الفتيلي يسجل كنتيجة لتراكم خلايا الانقسام الفتيلي في الطور البيني وعدم دخولها مرحلة M [18]. وهذا مؤكد في هذه الدراسة بوجود نسبة عالية من الخلايا في الطور البيني تحت المجهر الضوئي في العينات المعالجة مصاحبة لنقص معدل الانقسام في هذه العينات مقارنة بالضابط.

وقد يرجح ذلك الانخفاض في معدل الانقسام إلى وجود بعض المركبات الموجودة في مستخلص النبات مثل الفلافونيدات والتانيينات التي من المحتمل إنها تعمل بأكثر من آلية مؤهلة للعمل كمضاد للانقسام الخلوي وبالتالي كمضاد

للسرطان حيث من المعروف إن مركبات التانينات وظيفتها حماية النبات ضد أكلات الأعشاب ونشاط البكتيريا المثبتة للنتروجين وهي كذلك تمتلك خاصية ترسيب البروتين وتعمل عمل الأدوية لبعض أنواع القلويدات [30] وفي دراسة أخرى قيم فيها نشاط 6 أعشاب طبية صينية ضد benzo [a] Pyrene ووجد أن مركبات التانين كانت مسئولة عن منع التطفر Mutagenicity في بكتيريا salmonella ووفقاً لـ Bu-Abbas وآخرون 1996 وجد أن التركيز العالي من لفلافونيدات Flavonoids متواجدة في الشاي الأخضر مقارنة بالشاي الأسود والمنسب إليها المسئولية كمضاد للتطفر واحتمالية مضاد للسرطان بالإضافة إلى الباحث Ohtsuka وآخرون 1995 [23] الذي فحص تأثيرات تسعة مركبات نشيطة من النبات الطبي الصيني Sho-saiko-to على التأثير المطفر للمادة AF-2 ووضحت النتائج أن المجموعة النشطة الرئيسية هي Saponins و Flavonoids حيث إن الفلافونيدات هي عبارة عن جليكوسيدات . ولقد اثبت أن الجليكوسيدات المستخلصة من مصادر نباتية مختلفة لها نشاط مضاد للسرطان [21]. هناك دراسات أثبتت أن نبات الروبيا يحتوي على نسبة عالية من الجليكوسيدات والتربينات الثنائية مثل Marrubenol و Marrubiin كما يحتوي أيضاً على التانينات الريسين والزيوت الطيارة [11 , 16].

الجدول (1): معدل الانقسام (MI) في خلايا القمم المرستيمية لنبات البصل *Allium cepa* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الروبيا *Marrubium vulgare* و لنبات الروبيا *Marrubium alysson* لفترات زمنية مختلفة.

اسم النبات	الزمن / المعاملات	4 ساعات	12 ساعة	24 ساعة
نبات *Marrubium vulgare*	الضابط (Control)	**11.0013** (0.5609)	**11.3363** (1.0531)	**12.4347** (0.9003)
	التخفيف الثاني (10^{-3})	**8.6610** (0.6335)	**6.5200** (0.6386)	(0.3008) **4.7837**
	التخفيف الأول (10^{-1})	**6.0673** (0.3460)	**4.6560** (0.6925)	(0.1579) **3.4827**
	المستخلص الخام (Stock)	0.0000	0.0000	**0.0000**
نبات *Marrubium alysson*	الضابط (Control)	**10.2373** (1.0016)	**10.7623** (0.5970)	**10.5180** (0.5645)
	التخفيف الثاني (10^{-3})	**7.4550** (0.4458)	**6.6013** (0.6645)	(0.7118) **5.1540**
	التخفيف الأول (10^{-1})	**5.9107** (0.8488)	**5.0527** (0.1453)	(0.1950) **4.2577**
	المستخلص الخام (Stock)	**0.0000**	**0.0000**	**0.0000**

القيم ما بين القوسين = الانحراف المعياري.

2.3. تأثير مستخلص نبات *M. Vulgare* ونبات *M. alysson* على نسبة الطفرات

تضيف الدراسة الحالية في البيانات السابقة التأثير الطافر للمستخلصات المائية للنباتين *M alysson* و*M vulgare* على الخلايا المرستيمية القمية لجذر نبات البصل والذي يؤثر في معدل الانقسام بالإضافة إلى القياسات المجهرية الأولى لحساب قيم معدل الانقسام. فلقد تم حساب النسبة المئوية للطفرات في جميع العينات المعاملة التي صنفت إلى طفرات فسيولوجية وطفرات جينية . البيانات الخاصة بالخلايا الطافرة لنبات البصل و المعاملة بالتراكيز المختلفة للنباتين (التخفيف الثاني 10^{-3}، التخفيف الأول 10^{-1} والمستخلص الخام) ولفترات زمنية مختلفة (4، 12 و24 ساعة) موضحة في الجدول (2) .تبين هذه النتائج أن هناك اختلافات معنوية عالية بين التراكيز وبين الفترات الزمنية المختلفة وكذلك الزمن والتركيز معاً ($P<0.05$).

الجدول (2): أنواع ونسب الطفرات في خلايا القمم المرستيمية لنبات البصل *Allium cepa* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الروبيا *Marrubium vulgare* و *Marrubium alysson* لفترات زمنية مختلفة.

اسم النبات	الزمن	4 ساعات			12 ساعة			24 ساعة		
	المعاملات	نسبة الطفرات (%)	أنواع الطفرات (%)		نسبة الطفرات (%)	أنواع الطفرات (%)		نسبة الطفرات (%)	أنواع الطفرات (%)	
			جينية	فسيولوجية		جينية	فسيولوجية		جينية	فسيولوجية
نبات *Marrubium vulgare*	الضابط (Control)	**0.000**	0.00	0.00	**0.000**	0.00	0.00	**0.000**	0.00	0.00
	التخفيف الثاني (10^{-3})	**11.474**	38.98	61.02	**18.324**	37.70	62.30	**25.647**	33.77	66.23
	التخفيف الأول (10^{-1})	**27.530**	42.86	57.14	**33.924**	34.62	65.38	**42.333**	32.32	67.68
	المستخلص الخام (Stock)	100	---	---	100	---	---	100	---	---
نبات *Marrubium alysson*	الضابط (Control)	**0.000**	0.00	0.00	**0.000**	0.00	0.00	**0.000**	0.00	0.00
	التخفيف الثاني (10^{-3})	**10.474**	37.50	62.50	**10.011**	53.85	46.15	**19.451**	36.67	63.33
	التخفيف الأول (10^{-1})	**19.747**	57.32	42.68	**19.324**	46.58	53.42	**31.922**	50.77	49.23
	المستخلص الخام (Stock)	---	---	---	----	---	---	---	---	---

النسبة المئوية للطفرات بصفة عامة تزداد بزيادة تركيز المستخلص والوقت المعرض لكلا النباتين ولكن نسبة الطفرات الفسيولوجية المحدثة بواسطة نبات *M vulgare* كانت نسبتها تزيد عن الطفرات الجينية بتناسب طردي أي كلما زاد التركيز والوقت زادت الطفرات الفسيولوجية الغير طبيعية وهذه النتائج تتشابه مع البحوث الأخرى [6 ,14] بعكس مستخلص نبات *M alysson* الذي كانت النسب بين الطفرات الفسيولوجية والجينية متفاوتة ولكن بشكل متقارب نسبياً وقد ظهرت الطفرات عامة في كلا النباتين بصورة متعددة منها : الصبغيات المتأخرة Laggard chromosomes في الأطوار(الاستوائي والانفصالي والنهائي الشكل (3 أ وب) وهذا يمكن أن يعزى إلى فشل جهاز المغزل في القيام بوظيفته الطبيعية وتنظيم استطالة ألياف المغزل وبهذا يسبب توجيه شاذ للصبغيات [22] .

كذلك لوحظت الصبغيات المبعثرة في الطور الاستوائي C-metaphase (الشكل 3 ث) وتواجدت في اغلب الخلايا المعاملة بالتراكيز المختلفة من المستخلصات المائية لكلا النباتين وتكون الصبغيات في هذا النوع من الانحرافات سميكة وقصيرة ومنحرفة عن خط الاستواء ومتفرقة في السيتوبلازم ممكن أن يكون مؤشر لمنع حركة الصبغي الناتجة من تفاعل بين السنترومير وخيوط المغزل و/أو غياب تشكيل المغزل وجودها سابحة في السيتوبلازم [19, 28] . حدوث الصبغيات المبعثرة دليل أيضا على تفاعل المستخلص النباتي مع بروتين الخلية الذي يلعب الدور الأساسي في تشكيل ألياف المغزل [28]، تفاعله مع بروتين Tubulin الذي يؤدي إلي عدم تشكل خيوط المغزل [31] أو نتيجة نقص في كمية الطاقة وبالتالي تقل حركة الصبغيات إلي الأقطاب مما يؤدي الي ظهور طفرة التصاق الصبغيات Cromosomal stickiness (الشكل3 د) بشكل متكرر في الخلايا *Allium cepa* بعد المعاملة بالتراكيز المختلفة من المستخلصات النباتية لفترات زمنية مختلفة حيث يقترح إن هذه اللزوجة تحدث كنتيجة للطي الغير صحيح للألياف الصبغية إلى كروموتيدات وهكذا يحدث اختلاط الألياف والصبغيات فتصبح ملتصقة بعضها بالأخر بواسطة جسور تحت كروماتيدية Subchromatid [6] والتي تدل علي تأثير المستخلص علي البروتينات الخلوية ودرجة لزوجة السيتوبلازم بها (بشاشة، 2004) ، هذا الالتصاق يغطي كل الصبغيات المتكاملة مؤدياً إلي ظهور كتل كروماتينية [6].

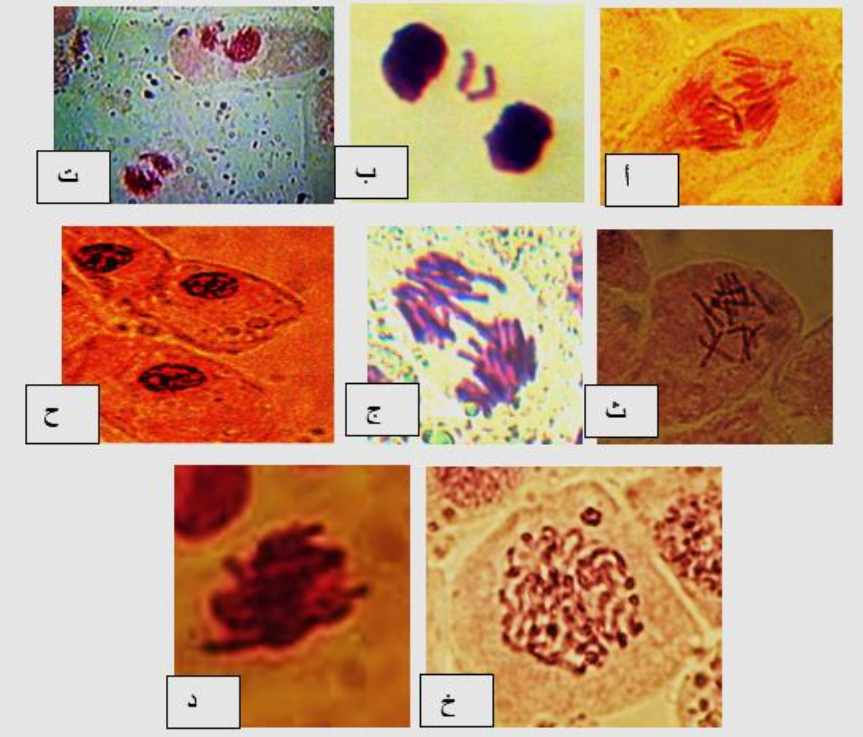
وجود جسور الكروماتيدية والصبغية عند الطور الانفصالي والنهائي كانت ملاحظة أيضا بعد المعاملة بالمستخلصات المائية لكلا النباتين في التراكيز المختلفة وجود هذا النوع من الانحراف لسلوك الصبغيات اثناء الانقسام قد ينتج من التصاق الصبغيات [6]بسبب هذا الالتصاق يصبح انفصال الصبغيات الشقيقة غير كامل حتى في وجود ألياف

المغزل ولهذا تبقى مرتبطة بجسور كروماتينية [25]. الجسور قد تنتج كذلك من كسر الصبغيات متبوع بالتحام الكروماتيد قرب المركز وتؤدي إلي صبغيات ثنائية المركز و بالتالي جسور في الطور الانفصالي أو النهائي.

في هذه الدراسة كانت هناك نسبة عالية من الطفرات الفسيولوجية من النوع التكثيف المبكر للصبغيات في الطور التمهيدي (الشكل3 خ) في الخلايا المعاملة بمستخلص كلا النباتين ويكون ناتج عن تفاعل المادة مع الهستون بروتين أثناء الانقسام الخلوي [31]. أيضاً ظهرت الأنوية الصغيرة (الشكل3 خ) التي يرجح تشكلها بواسطة الأجزاء الصبغية المتشكلة في آخر مرحلة G2 و التي لا تستطيع التصرف بشكل طبيعي في مرحلة الانقسام وتُرفض إلي خارج النواة [17].

وظهور كذلك في المعاملة بالمستخلص الخام عند كل فترات المعاملة المختلفة انحرافات الموت المبرمج Apoptosis المعتمدة على الطاقة وهو عملية مسيطرة عليها جينياً حيث فيها خلايا غير ضرورية أو متضررة تموت [10]أو تضرر DNA وبالتالي موت الخلية (الخلايا المرستيمية غير نشطة الشكل 3 ح) [15]. ولوحظ تمزق الأنوية في هذا التركيز عند كل فترات المعاملة المختلفة (الشكل3 ت)

تكرار كل هذه الطفرات وتسجيلها عند المعاملة بكلا المستخلصات دليل علي التأثير السمي علي الخلايا والمادة الوراثية. ففي كل المعاملات كان هناك زيادة غير طبيعية بزيادة تركيز المستخلص والزمن. وقد وجدت مثل هذه التأثيرات عند المعاملة بمستخلص *Amaranthus spinosus* علي الخلايا المرستيمية لنبات البصل [6]، وsaggoo وآخرون (1991[26]) بمستخلص نبات Tylophora.



الشكل (3): الطفرات الفسيولوجية والجينية المحدثة في الخلايا المعاملة بمستخلص نبات الروبيا *Marrubium vulgare* و *Marrubium alysson* لفترات زمنية مختلفة. (أ) تأخر كروموسوم في الطور الإنفصالي. (ب) تأخر كروموسوم في الطورالنهائي. (ت) تفتت الأنوية. (ث) الصبغيات المبعثرة في الطور الاستوائي. (ج) جسر في الطور الانفصالي. (ح) خلايا مرستيمة غير نشطة. (خ) نواة الصغيرة وتكثف مبكر في الطور التمهيدي.

3.3. تأثير المستخلصات المائية للنباتين على الكمية الكلية للحامض النووي DNA

أظهرت الدراسة الحالية بان كميات الحامض النووي DNA كانت حساسة إلى المستخلصات المائية للنبات *Marrubium vulgare* و *Marrubium alysson* في جميع التراكيز وأوقات التعرض (الجدول 3). يعتبر تخليق الحامض النووي DNA أهم المتطلبات الأساسية لانقسام الخلية وذلك أثناء دورة الخلية. حيث انه أثناء هذه الدورة وخصوصاً مرحلة S يكون الحامض النووي DNA في الغالب على شكل خيط مفرد ، لذلك جزيئ الـDNA يكون أكثر حساسية إلى الملوثات في الأوقات التعرض القصيرة [12]. ووجد أن الانحرافات الصبغية تكون مترافقة مع نشاط المواد الكيميائية تلك على الأحماض النووية DNA و/أوRNA [12, 33].

التغيرات في كمية DNA الكلية كانت متفاوتة في الزيادة والنقصان في الخلايا المعاملة، مقارنة مع الضابط. حيث إن كمية الـDNA الكلية زادت بصفة عامة في كلا النباتين وبصفة خاصة حدث نقص في العينات المعاملة بـ 10^{-1} عند 12ساعة و 10^{-3}، 10^{-1} عند 24ساعة لنبات *M alysson* وكذلك 10^{-1} ، 10^{-3} عند 12 ساعة لنبات *M vulgare* ،

الزيادة أو النقصـــان في المحتويات الحامضـــية يمكن أن تعزى إلى منع أو تحفيز تخليق DNA بالمعاملات المختلفة [14 ,8].

التغيرات في محتوى DNA قد يكون بســـبب التدخل بأيض الطاقة، حيث وَجَدَ ارتباطاً وثيقاً بين منع التخليق الحامضـــي النووي ومســتويات ATP المنخفضـــة في الأنســجة [12, 19]. في البيانات الحالية، التأثيرات الســيتووراثية للمستخلصـات المائية لكلا النباتين تؤدي تثبيط معدل الانقسـام نتيجة لتراكم الانحرافات الصبغية في مرحلة M الذي يؤدي إلى تدمير النواة وموت بالتالي تؤثر في درجة تخليق DNA والتي عادةً ما يكون منخفض لعدم اســـتمرار الدورة الخلوية [8, 33] أشـارت الكثير من الدراسـات إلى العلاقة بين التغيرات في نشـاط الانقسـام الفتيلي بالتغيرات في محتويات الحمض النووي كنتيجة للمعاملات من المواد الكيميائية.

في هذه الدراسة تم تسجيل زيادة عامة في محتوى الكلي لكمية محتوى DNA في الخلايا المعاملة بالمستخلصات المائية لكلا النباتين والتي ارتبطت النقص في قيم معدل الانقســـام الفتيلي مقارنة بالضـــابط، هذا الارتباط يوضـــح فرضـــية تراكم الخلايا في الطور البيني (نهاية مرحلة G_2) وعدم دخولها مرحلة M أثناء الانقسام الخلوي وهذا قد يؤدي إلى زيادة محتوى DNA في هذه العينات المعاملة [12]وأكدت هذه الفرضـــية من قبل Carballo وآخرون (2006 [7])، حيث وجدوا الانخفاض في معدل الانقســـام كان مصـــحوب مجهرياً بخلايا متراكمة في G2. هذا التراكم في الطور البيني في مرحلة G_2 اعتمد على نقطة التفتيش وهذا غير كافي لإكمال تصـــليح DNA ولهذا بعض خلايا G_2التي لم يتم إصـــلاح DNA فيها مرت بنقطة تفتيش المكيفة ودخلت إلى مرحلة الانقســام متأخرة بصــبغيات ذات ســلوك شــاذ . وجود كســور الصـبغيات والكروماتيدات ، تكون انويه صـغيرة وهي طفرات جينية تسـبب خلل الحامض النووي DNA مباشـرةً كانت دليل على هروب الخلايا من G_2 إلى مرحلة M وتصــــل إلى دورة الخلايا القادمة(G_1) بانحرافاتها والتي تؤدي إلى عدم استقرار DNA وظهور الطفرات الفسيولوجية.

الجدول (3) : تراكيز الحمض النووي DNA (ميكروجرام / مل) في خلايا القمم المرستيمية لنبات البصل *Allium cepa* المعاملة بتراكيز مختلفة من المستخلص المائي لنبات الروبيا *Marrubium vulgare* و *Marrubium alysson* لفترات زمنية مختلفة.

اسم النبات	المعاملات	4 ساعات	12 ساعة	24 ساعة
نبات ***Marrubium vulgare***	الضابط (Control)	(4.8020) 60.8550	(14.1756)62.6700	(3.9480)39.4783
	التخفيف الثاني (10^{-3})	(10.6005)101.6925	(3.7580)28.5883	(18.9661)55.1075
	التخفيف الأول (10^{-1})	(16.4142)59.2417	(5.3289)53.1917	(7.5725)83.5022
	المستخلص الخام (Stock)	(38.8474)155.5375	(38.1594)188.2075	(98.6651)305.8800
نبات ***Marrubium alysson***	الضابط (Control)	(9.2272)53.7825	(13.7328)99.2723	(3.8303)81.2233
	التخفيف الثاني (10^{-3})	(19.2185)90.3992	(7.0749)101.9950	(12.8138)73.0558
	التخفيف الأول (10^{-1})	(4.1952)96.9533	(11.7897)82.6350	(5.9457)75.7783
	المستخلص الخام (Stock)	(7.5645)81.3242	(21.8952)195.4675	(22.5039)167.1333

القيم ما بين القوسين = الانحراف المعياري

4. الاستنتاج

في هذه الدراســـة، التأثيرات المثبطة القوية للانقســـام الخلوي بزيادة التركيز والزمن، وجود معظم الطفرات من النوع الطفرات الفسـيولوجية ونقص الكمية الكلية للحامض النووي DNA وبالتالي ضـمور وتحلل معظم الخلايا تشـير إلى استخدامه كمضـاد للسرطان. ولكن نتائج السمية الجينية لمستخلص هذا النبات، زيادة كمية DNA ووجود الخلايا الطافرة التي اســـتطاعت الهروب من نقط التفتيش في الطور البيني من دورة الخلية تشـــير إلى أن الإدمان على اســـتخدامه حتى بجرعات بســيطة يكون خطر على حياة الإنســان ولأنه يؤثر على جزيء DNA بصــفة عامة ممكن أن يؤدي إلى حدوث السرطان في الأشخاص الغير مصابين.

5. التوصيات

1. التنويه الى خطورة استخدام هذا النبات في العلاج لما أظهره من تأثير على المادة الوراثية في الخلايا.
2. إعادة زراعة الخلايا المعاملة لمعرفة قدرة الطفرات على البقاء في الأجيال القادمة.

المـراجـــع

[1] القاضـي، عبدالله ؛ الرماح ، صـفية (1997) اسـتعمالات بعض النباتات في الطب الشـعبي الليبي.الجزء الأول . الطبعة الخامسـة، دار الكتب الوطنية، بنغازي.

[2] العيد، صبحي، موسوعة النباتات الشافية و المكملات الغذائية ،دار الكندي ، الأردن،2003.

[3] القاضي، عبدالله ؛ المغربي ، موسى، استعمالات بعض النباتات في الطب الشعبي الليبي.الجزء الثالث. دار الحكمة، 1999.

[4] الجازوي، فوزية مفتاح حمد، التأثيرات السـيتوروراثية للمسـتخلص المائي لنبات الفيجل *Ruta chalepensis* L. علي المادة الوراثية للخلايا المنقسمة في نبات البصل، رسالة ماجستير ،جامعة قاريونس ،كلية العلوم ،بنغازي، 2009.

[5] بشـاشـة، جميلة عبدالحفيظ، تأثير الاسـبرين، البارسـيتمول وفيتامين ج علي المادة الوراثية وسـلوك الصـبغيات اثناء الانقسـام الخلوي، رسـالة ماجستير ،جامعة قاريونس ،كلية العلوم ،بنغازي، 2004.

[6] V. Prajitha and J. E. Thoppil, Genotoxic and antigenotoxic potential of the aqueous leaf extracts of *Amaranthus spinosus* Linn. using *Allium cepa* assay. South African Journal of Botany, 2016, vol,102, pp. 18–25.

[7] J. A. Carballo, J. Pincheira and C. De La Torre, The G2 checkpoint activated by DNA damage does not prevent genome instability in plant cells. Biol. Res., 2006, vol. 39. No. 2, pp. 331-340.

[8] A. Badr, Effects of the s-Triazine herbicide Turbutryn on mitosis, chromosomes and nucleic acids in root tips of *Vicia faba* . Cytologia, 1986, vol. 52, no, 3, pp. 571-577.

[9] A. Bu-Abbas, X. Nunez, M. N. Clifford, R. Walker and C. Ioannides, A comparison of the antimutagenic potential of green, blank and decaffeinated teas: contribution of flavanols to the antimutagenic effect. Mutagenesis, 1996, vol. 11, pp. 597-603.

[10] W. C. Earnshaw, Nuclear changes in apoptosis. Curr Opin Cell Biol., 1995, vol. 7, pp. 337-343.

[11] S. EL bardai, M. wibo, M. Hamaide, B. lyoussi, J. quetin-leglergq, and N. morel, Characterisation of marrubenol, a diterpene extracted from *Marrubium vulgare*, as an L-type calcium channel blocker, *Br. J. Pharmacol.* , 2003, vol. 140, pp. 1211–1216.

[12] F.R. El-Garbulli and S.A. Mohamed, Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the detection of the brominal herbicide genotoxicity. The 10th International Chemistry Conference and Exhibition in Africa (10 ICCA). Benghazi, Libya. 2007.

[13] A. A. EL-Ghamery, A. I. EL-Nahas and M. M. Mansour, 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, 2000, vol. 65, no. 3, pp. 277-287.

[14] S. M. El-Yessiri, Genotoxic Effect of Nickel Sulfate on The Dividing Cells Using *Allium cepa* and *Saccharomyces cerevisiae* as Bioassays, M. Sc. Thesis, Univ. of Garyounis Faculty of science, Benghazi. 2008.

[15] G. Gorneva, R. Mateva, R. Gugova and E. Golovinsky, The study of the apoptogenic effect of pyrimidine derivatives on murine leukemia cells. Arch Oncol., 2005, vol. 13, pp. 62-64.

[16] M. Khanavi, L. Ghasemian, E. H. Motlagh, A. Hadjiakhoondi, and A. Shafiee, Chemical composition of the essential oils of *Marrubium parviflorum* Fisch. & C. A. Mey. and *Marrubium vulgare* L. from Iran, *Flavour and Fragrance J.*, 2005, vol. 20, pp. 324–326.

[17] J. Kwasniewska and A. W. Bara, Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation—The Past, Current Status, and Perspectives. Int. J. Mol. Sci. 2022, vol. 23, no.1306.

[18] K. Mahapatra, S. De, S. Banerjee and S. Roy, Pesticide mediated oxidative stress induces genotoxicity and disrupts chromatin structure in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seedlings. *J. Hazard. Mater.* 2019, vol. **369**, pp. 362–374.

[19] A. Majewska, E. Wolska, E. Śliwińska, M. Furmanowa, N. Urbańska, A. Pietrosiuk, A. Zobel, M. Kuras, Antimitotic effect, G2/M accumulation, chromosomal and ultrastructure changes in meristematic cells of *Allium cepa* L. root tips treated with the extract from Rhadiola roots. Caryologia, 2003, Vol. 56, pp. 337–351.

[20] L. P. Kumar and N. Panneerselvam, Cytogenetic studies of food preservative in *Allium cepa* L root meristem cells, Medicine Biol., 2007, vol. 14, no. 2, pp. 60-63.

[21] M. Kuroda, Y. Mimaki, A. Yokosuka, Y. Sashida and A. Beutler, Cytotoxic cholestane glycosides from the bulbs of Ornithogalum Saundersiae ,J. Nat. prod. , 2001, vol. 64, pp. 88-91.

[22] D. M. Leme and M. A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, 2009, vol. **682**, pp. 71–81.

[23] M. Ohtsuka, K. Fukuda, H. Yano and M. Kojior, Effects of nine active ingredients in Chinese herbal medicine sho-saiko-to on 2- (2-furly)-3-(5-nitro-2-furyl) acrylamid mutagenicity, Japanese J. of Cancer Res., 1995, vol. 86, pp. 1131-1135.

[24] S. M. Rates, Plants as source of drugs, Toxicon., 2001, vol. 39, pp. 603-613.

[25] F. Rashid, D. Singh, S. Attri, P. Kaur, H. Kaur, P. Mohana, J. Quadar, A. P. Vig, A. Bhatia, B. Singh, H. Walia and S. Arora1, Modulation of atrazine-induced chromosomal aberrations and cyclin-dependent kinases by aqueous extract of *Roylea cinerea* (D.Don) Baillon leaves in *Allium cepa. Scientific Reports*, 2022, vol. 12, no. 12570.

[26] M. Saggoo, S. Kumari, and Bindu, cytological effect of Indian medicinal plants I. Mitotic effects of leaf homogenate of *Tylophora indica* L. on *Allium cepa* , cytologia., 1991, vol. 56, pp. 633-637.

[27] S. Sen, and D. K. Kar, Cytology & Genetics. Alpha science, Harrow , U.K.

[28] M. M. Shehata, A. Habib, N. S. Khalifa, and M. S. Salama, Cytological and biochemical effects of 5-fluorouracil and colchicine on *Vicia faba* plants, Egypt. J. Biotech., 2000, 1: 218-233.

[29] J. E. Simon, A. F. Chadwick, and L. E. Craker, The scientific Literature On Selected Herbs, and Aromatic and medicinal plants Of the temperate Zone, Herbs, 1984, pp. 770.

[30] R. O. Teixeira, M. L. Camparoto, M. S. Mantovani and V. E. Vicentin, Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L.,in in vitro and in vivo assays, Genet. Mol. Biol., 2003, vol. 26, no. 4.

[31] M. Topaktas, and E. Rencuzogvullari, Cytogenetic effect of herbicides Gesagard and Lgran in Barley, cytologia, 1991, vol. 56, no. 3, pp. 419-424.

[32] S. Turkoglu, Genotoxic effect of mono-, di-, and trisodium phosphate on mitotic activity, DNA content, and nuclear volume in *Allium cepa* L., Mutat. Res., 2007, vol. 626 no. 1-2, pp. 4-14.

[33] S. Turkoglu, Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. cytologia, 2009, vol. 62 no. 3, pp. 71-179.

[34] S. J. Uddin, I. D. Grice and E. Tiralongo, Cytotoxic Effect of Bangladeshi Medicinal Plant Extracts. 2009.

[35] T. Wolski, D, Matosiuk, T. Baj and A. Ziewiec, White horehound (*Marrubium vulgare* L.) medicinal plant with multidirectional pharmacological activity, Post. Fitoterapii, 2007, vol. 8, pp. 39-45.