------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 1، ص 127- 141 ،2011------

التحري عن التأثير الوراثي لمستخلص نبات الميرامية *Salvia officinalis* على الفطر *Aspergillus amstelodami*

فاديه موفق الحيالي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 3/ 11 / 2010 ؛ تاريخ القبول 27 / 12 / 2010)

الملخص

تضمنت الدراسة التحري عن قدرة مستخلص الماء الساخن والمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية *Salvia officinalis* على إحداث تأثيرات وراثية على الخلايا حقيقية النواة ، وذلك من خلال اختبار قدرة هذه المستخلصات على حث طفرات جينية في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami* وباستخدام طرائق التطفير الثلاثة المعتمدة وهي المعاملة المسبقة والتضمين بالطبق والنمو الوسيط . لم تسجل الدراسة وجود أي تأثير تطفيري للتراكيز الأربعة تحت السامة Sub lethal 15، 20، 25، 30 مليغرام / $سم^3$ من مستخلص الماء الساخن و0.3 ، 0.5 ، 0.7 ، 0.9 مليغرام / $سم^3$ للمستخلص الكحولي، ومن دراسة تأثير المستخلص الكحولي عند التركيز 0.9 مليغرام / $سم^3$ على قياس دليل الانقسام Mitotic index لأطوار الانقسام في جذور البصل بعد فترة تعرض 24 و 48 ساعة ، لم تسجل الدراسة وجود أي تأثير على المجموعة الكروموسومية من حيث أطوار الانقسام وعدد وشكل الكروموسومات . وهذا يؤكد سلامة نبات الميرامية بوصفه نباتاً عشبياً دوائياً .

الكلمات الدالة : الميرامية ، القدرة التطفيرية ، *Aspergillus amstelodami* .

Predictive about the Genetic Effect of *Salvia officinalis* Extracts on the Fungus *Aspergillus amstelodami*

Fadeya M. Al-Hyaly
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The study aimed to detected of the ability extract hot water and alcohol extract of plant *Salvia officinalis* to cause genetic effects on Eukaryotic cells, by indicating the ability of these extract to induce genetic mutation in the conidia of fungus *Aspergillus amstelodami* using three mutation methods, pretreatment method, growth mediated method and plate incorporation method, the study didn't record any mutagenic effect at four sub lethal concentration 15, 20, 25, 30 mg/ml of hot water extract and 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 mg/ml of alcoholic extract and through the study of alcoholic extract at concentration of 0.9 mg/ml in calculating mitotic index of the division stages of onion root after 24-84 hours period of exposure, the study didn't record any effect on the chromosomal group during division stages and the chromosomal shape and this assure the safety of using *Salvia officinalis* in the different life styles.

Keywords : *Salvia officinalis* , mutagenicity , *Aspergillus amstelodami*.

المقدمة

يشهد طب الأعشاب هذه الأيام نهضة كبيرة في العديد من الدول وذلك بسبب القلق المتزايد من الآثـار الجانبية المرتبة على استخدام الأدوية الصيدلانية الكيميائية (شوفاليه، 2001)، الأمر الذي اسـترعى انتبـاه العديد من المنظمات العالمية ومنها منظمة الصحة العالمية (WHO) للوقوف على حقيقـة الفوائـد الطبيـة والعلاجية للعديد من المستخلصات النباتية (WHO, 1993) ، ومنها نبتة الميرامية *Salvia officinalis* التي تنتمـي للعائلـة الـشفوية Lamiaceae المنتـشرة فـي بلـدان البحـر الأبـيض المتوسـط (Antonio *et al.*, 2004 ; Irina, 2008). عرفت الميرامية منذ آلاف السنين وتعد نباتا شافيا للعديـد مـن الأمراض، واشتق الاسم العلمي للنبات من الكلمة اللاتينية Salvare وتعني النبات الشافي أو المعالج (يوسف وآخرين، 2006)، ولا تزال مستعملة بوصفها عشبه طبية لتخفيف نوبات السعال والربو وإزالـة الاحتقـان المخاطي في القناة التنفسية ومسكناً عاماً للآلام المعوية الحادة وعاملاً مضاد للالتهابـات (Velikovi *et al.*, 2007 ; Velikovi *et al.*, 2002)، وخافضاً لمستوى الكلوكوز في الدم ومنشطاً للذاكرة ومحسناً للوظـائف الذهنية كما استخدم في معالجة بعض حالات النسيان وفقدان الذاكرة بتأثيره على أنزيم اسيتايل كولين استريز Ache (Velikovi *et al.*, 2002; Masayuki *et al.*, 2005). يرجع التنوع الكبير في الخواص الـصيدلانية

لهذه النبتة إلى احتوائها على العديد من المركبات الفعالة الموجودة في أوراقها وهي مركبـات Terpenoid و Phenol و Flavonoid و Thujoun و Cineole وغيرها (Pierozan *et al*., 2009)، والتـي اسـتخدمت مضاداً للعديد من البكتريا السالبة والموجبة لصبغة كرام (Mitic-culafic *et al*., 2005) إضافة إلى دورهـا في تثبيط نمو الفطريات (Ileana and Opre, 2006 ; Pinto *et al*., 2007) ، فضلاً عن دورها فـي تثبـيط تـضاعف فيـروس Herpes simplex و Influenza virus (Velikovi *et al*., 2002)، ونظـراً لاحتـواء الميرامية على مادة مضادة للأكسدة Antioxidant فقد استخدمت مضاداً للـسرطان Anticancer (يوسـف وآخرين، 2006 ؛ Hitoshi *et al*., 2005). كما استخدمت مستخلصات الميرامية بشكل واسع بوصفها مواد حافظة ومنكهة للعديد من الأغذية و في تحضير العطور ومستحضرات التجميل (Irina , 2008).

ونظراً للاستخدام المتزايد لهذه النبتة فقد ارتأينا دراسة مدى سلامة استخدام مستخلصاتها من الناحيـة الوراثية وذلك بالتحري عن قدرتها في إحداث الطفرات الجينيـة فـي الفطـر *Aspergillus amstelodami* وكذلك دراسة قدرتها على إحداث تغيرات كروموسومية في جذور نبات البصل *Allium cepa* .

المواد وطرائق العمل

الكائن الاختباري

أجريت الدراسة باستخدام السلالة ($A_1(WA_1)$ من الفطر *A. amstelodami*، والتي تم الحصول عليهـا من أ.د. ساهي جواد ضاحي/ جامعة الموصل/ كلية العلوم/ علوم الحياة.

الأوساط الزرعية وظروف الزرع

اعتمد الوسطان الزرعيان، الوسط الأدنى غير المعضد Minimal medium (M) المضاف إليه مـواد الاختبار، و وسط مستخلص الشعير– ملح الطعام Malt extract salt medium (MTS) للحصول على اكبر عدد من الكونيدات ، وللحصول على مستعمرات منفردة أضيف إلى الوسط الغذائي (M) مادة Sodium deoxycholate (D) بتركيز نهائي قدره 400 مايكرو غرام/ سم^3 لنحصل على الوسط (MD)، (Caten, 1979).

المحلول الخزين للبينوميل Benomyl

حضر المحلول الخزين لمبيد (Benomyl) وذلك بإذابة 0.02 غرام من المبيد الفطري البنليت (الحاوي على مادة فعالة Benomyl بتركيز50%) في 500 سم^3 من الماء المقطر لنحـصل علـى محلـول بتركيـز20 مايكروغرام من المادة الفعالة/ سم^3 ، عقم المحلول بالموصدة لمدة 15 دقيقـة و حفـظ لحـين الاسـتعمال (Welker and Williams, 1980) .

تحضير مستخلصات أوراق نبات الميرامية

أولاً: تم الحصول على أوراق نبات الميرامية من الأسواق المحلية وجرى التأكد من تصنيفه في معشب قسم العلوم/ جامعة الموصل .

ثانياً: حضر المستخلص المائي لأوراق نبات الميرامية باعتماد طريقة (Riose *et al.*,1987) . أذيب 1 غرام من المستخلص المحضر في 5 سم^3 ماء مقطر للحصول على تركيز200 مليغرام **/** سم^3 ، عقم المحلول باستخدام المرشحات الغشائية Millipore membrane ذات حجم 0.22 (النعمان، 1998).

ثالثاً: حضر مستخلص الماء الساخن لأوراق نبات الميرامية وذلك بوضع 40 غم من أوراق نبات الميرامية في إناء حاوي على 160 سم^3 من الماء عند درجة الغليان، ترك المزيج ليبرد بعدها تم تحضير وتعقيم المستخلص بنفس خطوات تحضير المستخلص المائي (Riose *et al.*, 1987) .

رابعاً: حضر المستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية باعتماد طريقة (Grand *et al.*, 1988) المحورة عن طريقة (Verpoorte *et al.*, 1982). أذيب 1 غرام من المستخلص الكحولي الجاف في 5 سم^3 من المذيب العضوي Di methyl Sulfoxide (DMSO) للحصول على تركيز200 مليغرام **/** سم^3 ، عقم المستخلص بالبسترة عند درجة حرارة 62°م ولمدة 20 دقيقة (النعمان، 1998).

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

حدد (MIC) للمستخلصات (المائي والماء الساخن والمستخلص الكحولي) وكذلك البينوميل باستخدام الوسط M الحاوي على التراكيز التصاعدية 5، 10، 15، 20، 25، 30، 35، 40، 45 مليغرام**/** سم^3 من المستخلص المائي ومستخلص الماء الساخن، في حين استخدمت التراكيز 0.1،0.3، 0.5، 0.7، 0.9، 1، 1.5، 2، 2.5، 3، 3.5، 4، 4.5، 5، 5.5 مليغرام**/** سم^3 من المستخلص الكحولي، أما بالنسبة للبينوميل فكانت التراكيز المستخدمة هي 0.3، 0.4، 0.5 مايكرو غرام/ سم^3. أتبعت طريقة الوخز Point Inoculation بتلقيح عدة وخزات من السلالة A1 على طبق حاوٍ على الوسط M والمضاف إليه تركيز معين من المستخلص قيد الدراسة وبواقع ثلاثة أطباق (R3،R2،R1) لكل تركيز. حسبت النسبة المئوية للتثبيط بعد أربعة أيام من التحضين وذلك بحساب معدل أقطار المستعمرات الناميـة حول نقطة الوخز (الطائي، 2006).

تحضير العالق الكونيدي

حضر العالق الكونيدي للفطر *A.amstelodami* بتركيز 10^7 كونيدة / سم^3 من مزرعة حديثة عمرها أربعة أيام منماة على الوسط MTS وباستخدام Haemocytometer (Caten, 1979).

عزل الطافرات وحساب تكرارها

جرى عزل الطافرات التلقائية والمستحثة بمستخلص الماء الساخن والمستخلص الكحولي لأوراق نبـات الميرامية التي قاومت مبيد البينوميل عند تركيز نهائي قدره0.5 مايكروغرام/ سم^3 من وسط الزرع . حـسب تكرار حدوث الطافرات على أساس عدد الكونيدات الحية في العالق الكونيدي (الطائي، 2006).

دراسة التأثير التطفيري

تم دراسة التأثير التطفيري للمستخلصات قيد الدراسة وذلك بمعاملة كونيدات الفطر *A.amstelodami* مع أربعة تراكيز تصاعدية من المستخلص الكحولي 0.3، 0.5، 0.7، 0.9 مليغرام/ سم^3 ومستخلص المـائي الساخن 15، 20، 25، 30 مليغرام/ سم^3 لأوراق نبات الميرامية بأتباع طرق التطفير الثلاثة (طريقة المعاملة المسبقة Pretreatment method وطريقة النمو الوسيط Growth mediated method وطريقـة التـضمين بالطبق Plate incorporation method. تم حساب عدد الطافرات المقاومة للمبيد الفطري البينوميل التلقائية والمستحثة بمستخلص الماء الساخن والمستخلص الكحولي.

السيطرة الموجبة

استخدم حامض النتروز HNO_2 مطفراً كيميائياً (السيطرة الموجبة) وذلك للتأكد من قابلية السلالة A1 على الطفور عند معاملتها بمطفر معلوم (Azevedo, 1970).

دراسة التأثيرات الخلوية

درست التأثيرات الخلوية للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية على خلايا جذور نبات البـصل *Allium cepa* وذلك بوضع الأبصال في قنانٍ حاوية على كمية من الماء كافية لغمر قواعدها، ومع بدء تكون الجذور نقلت الأبصال إلى قنانٍ حاوية على المستخلص الكحولي لنبات الميرامية بتركيز 0.9 مليغرام / سم^3 مع مراعاة ترك بعض الأبصال في الماء الاعتيادي (عينة سيطرة). بعـد مـرور 24 و 48 سـاعة علـى تعريض الجذور للمستخلص قيد الدراسة انتزعت الجذور وثبتت وصبغت بصبغة الأورسين الخلـي aceto orcein حسب طريقة (Waisel, 1962). بعدها حضرت منها شرائح لملاحظة المجموعـة الكروموسـومية خـلال مراحـل الانقـسام الخيطـي المختلفـة وحـسب دليـل الانقـسام Mitotic index (Ecole *et al*., 1994) وذلك من خلال:

$$MI = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عدد الخلايا المنقسمة والبينية}} \times 100$$

التحليل الإحصائي

تم إجـراء التحليـل الإحـصائي للنتـائج باسـتعمال اختبـار t عنـد مـستوى معنويـة 0.05 ≥ (الراوي، 1980).

النتائج والمناقشة

1. التركيز المثبط الأدنى (MIC)

من خلال تتبع نتائج التأثير التثبيطي للتراكيز المتصاعدة من المستخلص المـائي و مـستخلص المـاء الساخن والمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية والموضحة في الجداول (1،2،3) تبين وجـود علاقـة طردية بين الزيادة في تركيز المستخلصات والنسبة المئوية للتثبيط إذ تراوحت النسبة المئوية للتثبيط 12.5% و 43.25% عند التركيز 5 مليغرام/ سم^3 و45 مليغرام/ سم^3 على التوالي بالنسبة للمستخلص المائي و نسبة تثبيط 28.3% و71.28% مع التركيز5 مليغرام/ سم^3 و45 مليغرام/ سم^3 على التوالي مع المستخلص المـاء الساخن بينما أعطى المستخلص الكحولي نسبة تثبيط 26.00% عند التركيز 0.1 مليغرام/ سم^3 و94.1% عند التركيز5.5 مليغرام/ سم^3.

الجدول 1 : أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيـز مختلفة من المستخلص المائي لأوراق نبات الميرامية.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	تكرار أقطار المستعمرات (سم)				النسبة المئوية للتثبيط
	R1	R2	R3	المتوسط	
0	4.0	4.0	4.0	4.0	-
5	3.5	3.5	3.5	3.50	12.50
10	3.4	3.5	3.3	3.40	15.00
15	3.2	3.2	3.3	3.23	19.17
20	3.1	3.3	3.2	3.20	20.00
25	3.1	3.0	3.0	3.03	24.18
30	2.9	2.8	2.9	2.86	28.35
35	2.7	2.8	2.7	2.73	31.68
40	2.5	2.5	2.5	2.5	37.50
45	2.4	2.2	2.2	2.27	43.25

R1،R2،R3 : مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* عند كل تركيز.

الجدول 2 : أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيـز مختلفة من المستخلص الماء الساخن لأوراق نبات الميرامية.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	تكرار أقطار المستعمرات (سم)				النسبة المئوية للتثبيط
	R1	R2	R3	المتوسط	
0	4.8	4.5	4.8	4.7	-
5	3.4	3.3	3.4	3.37	28.3
10	3.1	3.1	3.0	3.07	34.68
15	2.7	2.8	2.7	3.73	41.91
20	2.6	2.5	2.4	2.40	48.94
25	2.1	2.3	2.1	2.17	53.83
30	2.0	2.0	2.0	2.0	57.45
35	1.5	1.6	1.6	1.56	66.67
40	1.4	1.4	1.5	1.43	69.51
45	1.3	1.4	1.35	1.35	71.28

R3،R2،R1 : مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر *A . amstelodami* عند كل تركيز.

الجدول 3 : أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيـز مختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	تكرار أقطار المستعمرات (سم)				النسبة المئوية للتثبيط
	R1	R2	R3	المتوسط	
0	4.5	4.2	4.0	4.23	-
0.1	3.0	3.2	3.2	3.13	26.00
0.3	2.5	2.3	2.5	2.43	42.60
0.5	2.2	2.3	2.4	2.3	45.60
0.7	1.8	2.0	1.85	1.88	55.56
0.9	1.6	1.7	1.7	1.67	60.52
1	1.6	1.5	1.6	1.57	62.88
1.5	1.4	1.4	1.45	1.42	66.43
2	1.3	1.2	1.2	1.23	70.92
2.5	1.2	1.1	1	1.1	73.99
3	1.1	1.05	1	1.05	75.17
3.5	0.85	0.85	0.9	0.87	79.43
4	0.7	0.6	0.7	0.67	84.16
4.5	0.5	0.5	0.44	0.48	88.67
5	0.3	0.4	0.35	0.35	91.73
5.5	0.3	0.25	0.2	0.25	94.10

R3،R2،R1 : مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر *A . amstelodami* عند كل تركيز.

وهذه النتائـج تتفـ ـق مع العديـد من الدراسـات التي أشارت إلى فعـاليتها المضـادة للفطريـات Antifungal ومنهـا الفطـر المـستخدم (Ileana and Opre, 2006 ; Pinto *et al*., 2007) وبمـا أن المستخلص المائي قد أعطى نسبة تثبيط منخفضة مقارنة بمستخلص الماء الساخن والمستخلص الكحولي لـذا فقد اقتصر البحث على دراسة قدرة مستخلصات الماء الساخن والمستخلص الكحولي على إحـداث طفـرات أماميـة في الفطـر *A. amstelodami* ، وعليـه فقد تم اختيار أربعة تراكيز تحت سـامة Sub lethal (McCann and Ames, 1978) وهي 15، 20، 25، 30 مليغرام **/** سم^3 من المستخلص المـاء الـساخن والتراكيز 0.3، 0.5، 0.7، 0.9 مليغرام**/** سم^3 بالنسبة للمستخلص الكحولي، وبما أن المبيد الفطري البينوميل أعطى نسبة تثبيط 100% عند التركيز 0.5 مايكروغرام/ سم^3 لذا فقد عَدَ هذا التركيز هو التركيـز الـسام للبينوميل واستخدم لعزل الطافرات، الجدول (4).

الجدول 4 : أقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيـز مختلفة من المبيد الفطري البينوميل.

تركيز المادة مايكروغرام / سم^3	تكرار أقطار المستعمرات (سم)			المتوسط	النسبة المئوية للتثبيط
	R1	R2	R3		
0	4.5	4.2	4.0	4.23	-
0.3	0.4	0.5	0.45	0.45	89.36
0.4	0.2	0.3	0.22	0.24	94.33
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	100

R3،R2،R1 : مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر *A . amstelodami* عند كل تركيز.

2. التحري عن التأثير التطفيري لمستخلص الماء الساخن لأوراق نبات الميرامية

تبين نتائج التحليل الإحصائي للتحري عن الطافرات بالطرق الثلاثة الجداول (5، 6، 7) عدم وجـود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 5 0.0≥ وهذا يشير إلى عدم قدرة المستخلص الماء الساخن للميراميـة بجميع تراكيزه المدروسة على إحداث الطفرات الوراثية فـي الفطـر *A. amstelodami* مقارنـة بتكـرار الطافرات التلقائية والمقاومة للمبيد بينوميل .

الجدول 5 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة في كونيـدات الفطـر *A. amstelodami* بعـد معاملتها بمستخلص الماء الساخن لأوراق نبات الميرامية بطريقة المعاملة المسبقة.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0.239	0.119	0	0.0689 ± 0.119	-
15	0	0	0	0 ± 0	1.727
20	0	0	0	0 ± 0	1.727
25	0.129	0	0.136	0.044 ± 0.088	0.38
30	0.269	0.426	0.279	0.051 ± 0.325	2.408
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملـة بحـامض النتـروز (الـسيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥. $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتـي تقـارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

الجدول 6 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة فـي كونيـدات الفطـر *A. amstelodami* بعـد معاملتها بمستخلص الماء الساخن لأوراق نبات الميرامية بطريقة التضمين بالطبق.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0.085	0	0.092	0.0296 ± 0.059	-
15	0	0	0	0 ± 0	1.993
20	0.38	0	0	0.127 ± 0.127	0.521
25	0	0.285	0.435	0.128 ± 0.240	1.377
30	0.588	0.449	0	0.189 ± 0.379	1.665
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملـة بحـامض النتـروز (الـسيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥. $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتـي تقـارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

الجدول 7 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة في كونيـدات الفطـر *A. amstelodami* بعـد معاملتها بالمستخلص المائي الساخن لأوراق نبات الميرامية بطريقة النمو الوسيط.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ الفياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0	0	0.132	0.044 ± 0.044	
15	0	0	0	0 ± 0	1
20	0	0	0	0 ± 0	1
25	0.753	0.556	0	0.225 ± 0.436	1.709
30	1	0.430	1	0.190 ± 0.810	3.927
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملـة بحـامض النتـروز (الـسيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥. $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتـي تقـارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

3. التحري عن التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية

تشير نتائج التحليل الإحصائي لبيانات الجداول (8، 9، 10) إلى عدم وجود فروقـات معنويـة فـي قـدرة المستخلص الكحولي عند التراكيز (0.3، 0.5، 0.7، 0.9) مليغرام / سم^3 بالطرق الثلاثة المدروسـة علـى تطفير كونيدات الفطر *A. amstelodami* عند مستوى احتمالية 0.05 ≥ مقارنة مع تكرار الطافرات التلقائية المقاومة للمبيد بينوميل.

الجدول 8 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة فـي كونيـدات الفطـر *A. amstelodami* بعـد معاملتها بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية بطريقة المعاملة المسبقة.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ الفياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0	0.258	0	0.086 ± 0.086	
0.3	0	0	0	0 ± 0	1
0.5	0	0	0	0 ± 0	1
0.7	0.182	0.172	0	0.059 ± 0.118	0.306
0.9	0	0	0.193	0.064 ± 0.064	0.205
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملـة بحـامض النتـروز (الـسيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥. $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتـي تقـارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

الجدول 9 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد معاملتها بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية بطريقة التضمين بالطبق.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0	0	0.092	0.0296 ± 0.059	-
0.3	0	0	0	0 ± 0	1.993
0.5	0.38	0	0	0.127 ± 0.127	0.521
0.7	0	0.285	0.435	0.128 ± 0.240	1.377
0.9	0.588	0.449	0	0.189 ± 0.379	1.665
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملة بحامض النتروز (السيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥ $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتي تقارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

الجدول 10 : تكرار الطافرات ($\times 10^{-6}$) المقاومة والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد معاملتها بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية بطريقة النمو الوسيط.

تركيز المادة مليغرام / سم^3	مكررات تكرار الطافرات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0	0	0.092	0.0296 ± 0.059	-
0.3	0	0	0	0 ± 0	1.993
0.5	0.38	0	0	0.127 ± 0.127	0.521
0.7	0	0.285	0.435	0.128 ± 0.240	1.377
0.9	0.588	0.449	0	0.189 ± 0.379	1.665
HNO_2	17.45	18.74	17.45	0.43 ± 17.88	34.55*

0: بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية (السيطرة السالبة). HNO_2: المعاملة بحامض النتروز (السيطرة الموجبة). * :معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥ $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتي تقارن متوسط تكرار الطافرات من كل معاملة مع متوسط المعاملة صفر.

تبين مقارنة متوسط تكرار الطافرات المستحثة بمستخلص الماء الساخن والمستخلص الكحولي مع متوسط تكرار الطافرات المستحثة بحامض النتروز (السيطرة الموجبة) إلى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 ≥ وهذا يدل على أن السلالة *A1* هي سلالة قابلة للطفور إذ استجابت للتأثير

التطفيري لحامض النتروز وهذا يشير إلى إمكانية استخدام هذه السلالة للكشف عن القدرة التطفيرية المحتملة للمواد قيد الدراسة.

تشير النتائج المبينة في الجداول (5، 6، 7، 8، 9، 10) إلى عدم وجود تأثير تطفيري لمستخلصات أوراق نبات الميرامية قيد الدراسة على كونيدات الفطر *A. amstelodami* ضمن الظروف التجريبية المتبعة. وهذا يتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى عدم قدرة مستخلصات نبات الميرامية على إحداث الطفرات الوراثية في كائنات بدائية النواة والتي جرى الكشف عنها باستخدام اختبار Ames test المعتمد على سلالات *Salmonella* ، وكذلك اختبار SOS chromo test المعتمد على *E. coli* (Filipic and Baricevi, 1997 ; Vukovic *et al*., 2006).

4. دراسة التأثير الخلوي

ونظرا لكون مستخلصات الميرامية قيد الدراسة لم تظهر أي تأثير تطفيري على كونيدات الفطر *A. amstelodami* لذا ارتأينا التحري عن التأثيرات الخلوية المحتملة للمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية على المجموعة الكروموسومية لجذور نبات البصل من خلال دراسة مراحل الانقسام الخيطي المختلفة.

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لدراسة دليل الانقسام Mitotic index (MI) للمعاملات عند مستوى احتمالية 0.05 ≥ عدم وجود فروقات معنوية بين متوسطات MI للمعاملة بالمستخلص الكحولي مقارنة مع متوسطات MI غير المعاملة (السيطرة السالبة) الجدول (11).

الجدول 11 : النسبة المئوية لدليل الانقسام MI بعد معاملتها بالمستخلص الكحولي لأوراق نبات الميرامية بتركيز (0.9) ملغرام/ سم^3 بفترات زمنية مختلفة.

زمن التعرض للمستخلص الكحولي لنبات الميرامية (بالساعة)	مكررات MI			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	24.6	27.71	20.63	2.048 ± 24.31	-
24	20.16	22.84	22.09	0.798 ± 21.69	1.189
48	17.81	20.53	25.26	2.177 ± 21.20	1.040

0 : بدون معاملة وتمثل السيطرة. $t_{(4)}$: قيمة الإحصاء t لأربع درجات من درجات الحرية والتي تقارن متوسط دليل الانقسام من كل معاملة مع متوسط دليل الانقسام من المعاملة صفر.

وبهذا نستنتج أن مستخلص نبات الميرامية لم يؤثر على أطوار الانقسام في الخلية وكذلك لم يؤثر على عدد وشكل المجموعة الكروموسومية وهذا يؤكد سلامة استخدامه من الناحية الوراثية، إضافة إلى ذلك فان

احتواءه على مركب Flavonoid الفعال في تثبيط نمو الأورام (يوسف وآخرين، 2006). كذلك احتواؤه على مركبات Phenol و Monoterperoid وغيرها والتي تعد مواد مضادة للتطفير الحيـوي Bioantimutagen، إذ تمتلك فعالية بيولوجية تعمل على تخفيض القابلية التطفيرية من خلال إبطالها لعملية التطفير أو قـد تقـوم بإصلاح عطب DNA الناتج عن أي مطفر فيزيائي أو كيميائي وبهذا عدَت الميرامية من النباتات المـضادة للطفرة Anti mutagen (Simic *et al*., 1996 ; Knezevic *et al*., 2005).

المصادر العربية

الراوي، خاشع محمود (1980). "مدخل إلى علم الإحصاء" . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصـل، العراق ، ص 309-354.

شوفاليه، اندرو (2001). "التداوي بالأعشاب والنباتات الطبية". أكاديميا انترناشيونال، بيروت، لبنـان.339 ص.

الطائي، رافع قاسم محمد (2006). تأثير مستخلصات الثوم على القابلية التطفيريـة لكـل مـن الـسورالين والأشعة فوق البنفسجية في الفطر *Aspergillus amstelodami*. رسالة ماجستير، كليـة التربيـة، جامعة الموصل، العراق.

النعمان، أديبة يونس شريف حمو (1998). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو و أيـض عدد من الجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم، جامعة الموصـل، العراق.

يوسف، جهاد ؛ عبد المجيد، نادية؛ أبو زيد ،أمية ؛ قمصاني، طه (2006). التأثيرات العلاجيـة لمجموعـة الأوراق العشبية لشاي الأخضر والميرامية على سرطان الكبد. *مجلة جامعة الملك عبـد العزيـز، العلوم* . **19** ، 25-55 .

المصادر الأجنبية

Antonio, R.; Diego, R.; Antonio, P.J. ; Concepcion, O. (2004). Numerical taxonomy study of Salvia sect. Salvia (Labiatae) . *J. Linnean Society*. **145**(3), 353-371.

Azevedo, J. L. (1970). Recessive Lethal induced by nitrous acid in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.*,**10,**111-117.

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.

Ecole, D. D.; Schoevaert, D.; Noin, M. ; Perbal, G. (1994). Densitometric analysis of nuclear DNA content in lentil roots grown in space. *The Cell* **. 81**, 59-64.

Filipic, M.; Baricevi, B. (1997). P XVII B.44 Antimutagenic activity of Salvia officinalls extracts against UV induced mutations in *E. coli* strains. *Mut. Res*. **379** (44), S182-S183.

Grand, A. ; Wondergem, P. A. ; Verpoorte, R. ; Pousset, J. L. (1988). Anti-infections phytotherapies of the tree Savannah of Senegal (West–Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. *Ethnopharmacol*ogy., **22**, 25 – 31.

Hitoshi, K. ; Sachiko, S.; Takamasa, A. ; Hiromu, S. (2005). Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* **18**(1),162-166.

Ileana, C. F.; Opre, E. (2006). Ethanol extracts of salvia officinalis exhibit antifungal properties against *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Chimie, Anul*. **I**, 51-55.

Irina, G. (2008). Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated *in vitro*. *botany***. 4**(4), 430-436.

Knezevic, V. J.; Vukovic, G. B.; Stevic, T.; Stanojevic, J. ; Nikolic, B. ; Simic, D. (2005). Antimutagenic effect of essential oil of sage *Salvia officinalis L.* and its fractions against uv-induced mutations. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, **57** (3), 163-172.

Masayuki, Y.; Hiroshi, S.; Kiyofumi, N.; Norihisa, N.; Naoki, K.; Tomoe, Y.; Toshio, M. ; Hisashi, M. (2005). Salacia, artichoke, sage [in Japanese] 60 (P-31) search for antiobestic constituents from several herbal medicines: Salacia, Artichoke, and Sage in Japanese. *National Institute of Informatics*. **44**, 349-354.

McCann, J. ; 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.

Mitic-culafic, D. ; Vukovic-Gacic, B.; Knezevic-Vukcevic, J. ; Stankovic, S. ; Simic, D. (2005). Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis L*). *Arch. Biol. Sci. Belgrade*. **57**(3), 173-178.

Pierozan, M. K. ; Pauletti ,G.F.; Rota, L.; Santos A. C. A.; LerinL. A.; Luccio, M.; Mossi, A. J.; Atti-Serafini, L.; Cansian R.L. ; Oliveira, L. (2009). Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Cienc. Tecnol*. **29** (4), 764-770.

Pinto, E.; Salgueiro, L. R. ; Cavaleiro, C. ; Palmeira, A. ; Gonçalves, M. J. (2007). *In vitro* susceptibility of some species of yeasts and filamentous fungi to essential oils of *Salvia officinalis*. *Industrial Crops and Products*. **26**(2), 135-141.

Riose, J. L. ; Recio, M. C. ; Villar, A. (1987). Antimicrobial activity of selected plants employed in the Spanish Mediterranean area. *Ethnopharmacol*ogy. **21**, 139 – 152.

Simic, D.; Vukovic-Gacic, B.; Knekzevic-Vukcevic, J. ; MJankov, J. (1996). Antimutagenic activity of plant extracts. I. Effect of terpenoids from sage (*Salvia officinalis* L.) *Mut. Res*., **360**(3), 269.

Velikovi, A.; Risti, M.; Velikovi, D.; Ili S. ; Mtti, N. (2002). The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. *Serb. Chem*. *Soc*. **68**(6), 435–445

Velikovi, D. T. ; Nikolova, M. T. ; Ivancheva, S. V. ; Stojanovi, J. ; Velikovi, V. (2007). Extraction of flavonoids from garden (*Salvia officinalis* L.) and glutinous (*Salvia glutinosa* L.) sage by ultrasonic and classical maceration. *Serb. Chem*. Soc. **72**(1),73–80

Verpoorte, R. ; Tginastoi, A. ; Vandoorm, H. ; Svendsen, A. B. (1982). Medical plant of Serinam, L-Antimicrobial activity and some medicinal plant.. *Ethnopharmacology.* **5**, 221 – 226.

Vukovic, G. B.; Nikcevic, S. S.; Berić-B.T.; KnezevicV., J. ; Simic, D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chem. Toxico*l. **44**(10),1730-1738.

Waisel, Y. (1962). Ecotypic differentiation in the Flora of pales. *Bull. Res. Council. pal*. **3**,174-176.

Welker, D. L. ; Williams, K. L. (1980). Miotic arrest and chromosome doubling using thiabendzole, cambendazole, nocodazole and benlate in the slim mold *Dictyostelium discoideum. Gen. Microbiol*, **116,** 407 – 497.

World Health Organisation: Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **(**1993**).** *Herbal Gram*, **28**, 13-14.