مجلة البصرة للعلوم الزراعية 2012، 25(1): 50-58

دراسة التأثيرات السمية الوراثية والخلوية للمبيد الحشري Dichlorvos في جذور نبات البصل *Allium cepa* L.

فائزة عبد الوهاب احمد ونور حامد غنتاب
قسم علوم الحياة، كلية التربية ، جامعة البصرة، العراق

المستخلص. أجريت الدراسة لبيان تأثير تراكيز مختلفة من المبيد الحشري Dichlorvos ($C_4H_7Cl_2O_4P$) في الخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل بإستخدام التراكيز (0.1 و0.2 و 0.3 و 0.4) مل/ لتر . وشملت المعايير المدروسة حساب عدد التشوهات الكروموسومية وأنواعها، ومعامل الانقسام الخيطي.أدت زيادة تراكيز المبيد إلى انخفاض معنوي في عدد الخلايا المنقسمة والأطوار مقارنة مع مجموعة السيطرة والذي إنعكس سلباً على معامل الانقسام الخيطي. كما إستحث المبيد ظهور العديد من التشوهات الكروموسومية إذ تفوقت التراكيز (0.1 ,0.2) مل/ لتر معنوياً ($P<0.05$) ومجموعة السيطرة الموجبة في كل من التشوهات (الجسور الكروموسومية والكروموسومات المتأخرة والجسور المكسورة)، في حين كانت ألتراكيز (0.3 ، 0.4) مل/ لتر اقل ما يمكن في اظهار هذه التشوهات في حين لم تظهرها مجموعة السيطره السالبه .وتفوقت مجموعـــة السيطرة الموجبـــة في كل من التكتل والقطع الكروموسومية والكروموسومات المشتتة والطور التمهيدي المحبب) مقارنة مع باقي مجاميع تراكيز المبيد الأخرى.

الكلمات المفتاحية: السمية الوراثية، الانقسام الخيطي، الديكلورفوس.

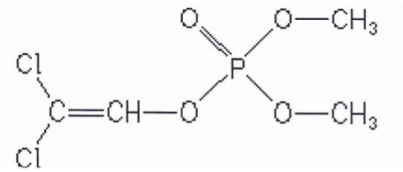
المقدمة

أصبح إستخدام المبيدات جزء مهم من الزراعة لحديثة حيث تنفق مليارات الدولارات سنوياً على المواد العضوية و المواد المضادة للبكتريا والحشرات. وبعض هذه المواد لا تعمل على تغيرات في البيئة وحسب، بل على أحداث تغيرات غير مرغوبة في الأحياء (2). يمتلك عدد من هذه المواد تاثيرات مختلفة فقد تكون مسرطنة Carcinogenic أو مطفرة Mutagenic أو تسبب تشوهات جينية Teratogenic. أن المواد التي تسبب تشوهـات كروموسومية تسبب أيضاً في تحطم المادة الوراثية (14).

تعد النباتات ذات الرتبة العالية نموذجاً وراثياً جيداً لتقييم الملوثات البيئية والتسمم الوراثي للمواد الكيميائية الخطرة والضارة في مختلف البيئات ولسنوات عديدة وكذلك تشمل التشوهات الوراثية التي تختلف من الطفرات النقطية إلى التقزم الكروموسومي والأنوية المتعددة لخلايا الأنسجة المختلفة مثل الأوراق والجذور للعديد من النباتات و يعد البصل و الذرة من بين النباتات التي تستخدم في تقييم التلوث البيئي و ذلك من خلال دراسة التسمم الوراثي Genotoxicity. إن إختبار نبات البصل هو من الإختبارت الحيوية و الحساسة و السريعة و يستخدم قياس السمية و السمية الوراثية. وهو إختبار سهل الإنجاز وذات تكلفة واطئة و يظهر علاقة جيدة مع الإختبارات التي تستخدم اللبائن (10).

تعتبر المبيدات الفسفورية العضوية مسرطنة و قد تسبب تشوهات جينية (وراثية) والإخلال بالنشاط الهرموني، علاوة على العقم و تسمم الجنين (في حالة النساء الحوامل) والتشوهات الخلقية (11).ويعد مبيد الديكلورفوس Dichlorvos من المبيدات الحشرية الفسفورية العضوية، إذ يشكل الفسفور جزءاً أساساً في

تركيبه الكيميائي، و المبيد مادة سامة يقتل ما يقدر بـ 20000 ألف شخص سنوياً (9). سجلت مواصفات خطرة لهذا المبيد في ولاية كاليفورنيا 1996 إعتمدت على دراسات على الحيوانات (8). أسمه التجاري (أغرينوز) وصيغته الجزيئية $C_4H_7Cl_2O_4P$ الموضح تركيبه في الشكل الآتي:



Dichlorvos

يعمل المبيد الحشري في القضاء على حشرة المن والتربس واليرقات الصغيرة و العناكب الحمر وغيرها في البصل و الطماطا و البطاطا و الخضراوات الأخرى (5). يؤثر هذا المبيد في التنفس و قد يسبب خروج دم أو سوائل من الأنف وسعال وعدم الراحة ومن أعراضه المتأخرة الشحوب و فقدان الوعي و التقيؤ و الإسهال والتقلص في منطقة البطن وألم في الرأس، ويؤدي إلى تقلص لاإرادي للعضلات (9). وقد يسبب تعرق موقعي (1). وتهدف الدراسة الحالية الكشف عن بعض الأضرار الوراثية والخلوية لمبيد Dichlorvos في الخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل .*Allium cepa* L.

المواد وطرائق العمل

1- النباتات المختبرية Laboratory Plants

أستخدم في هذه الدراسة عينات من نبات البصل .*Allium cepa* L والتي تم جلبها من السوق المحلية، خزنت في مكان بارد وجاف في كلية التربية – قسم علوم الحياة – مختبر الوراثة، بوزن يقارب 25 – 40 غم، وكانت غير معاملة بأي نوع من منظمات النمواو المبيدات، وتهمل الأبصال التي تكون مصابة بأي نوع من الفطريات و تزال الطبقة الخارجية الصفراء بعناية لغرض عدم تلف أوليات الجذور Roots primordial .

أستخدمت التراكيز التجريبية للمبيد الحشري Dichlorvos (0.1 و 0.2 و 0.3 و 0.4) مل/لتر حسب Ec_{50}، من إنتاج شركة Germany – Syngenta.

استخدمت طريقة العمل حسب **(12)** مع بعض التحويرات وقسمت العينات الى ثلاث مجموعات (السيطرة السالبة والموجبة والمعاملات) والتي شملت الآتي:

نميت سبع رؤوس من البصل في المحاليل المخففة للمواد المدروسة (ماء مقطر – سايكلوفوسفومايد – الديكلورفوس)، ثم غيرت هذه المحاليل بمحاليل آنية التحضير لكل 24 ساعة و لمدة 48 ساعة من التنمية. بعد ذلك قطعت القمم النامية للجذر (الخلايا المرستيمية) بطـول (1 – 2) ملم ويكـون (2 – 3) جذر لكل شريحة، وبواقع (3 – 4) شريحة/عينة ومن التركـيز الواحـد بيـن(18 – 24) شريحة ويحسب 5000 خلية لكل تركيز. وضعت القمم النامية في زجاجة ساعة وثبت بمحلول كارنوي لمدة 15 دقيقة ثم غسلت بعدها بالكحول المطلق، ثم صبغت بصبغة الاسيتوكارمن acetocarmin لمدة (2– 3) دقائق. غطيت بغطاء الشريحة Cover Slides وضغطت بواسطة قلم رصاص أو بإصبع اليد من أجل الهرس. لصق غطاء الشريحة بصورة جيدة بصبغ الأظافر، ثم فحصت جميع الشرائح بالمجهر الضوئي وعلى قوة تكبير X 100 بالعدسة الزيتية.

- الاختبارات المستخدمة بالدراسة:

معامل الإنقسام الخيطي Mitotic Index: أستخدمت الشرائح المحضرة مختبرياً نفسها للقمم النامية لجذر نبات البصل، إذ فحصت الشرائح وحسب معامل

الإنقسام الخيطي وفقاً لطريقة (13) وفقاً للمعادلة التالية:

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

التشوهات الكروموسومية: حسبت انواع مختلفة من التشوهات الكروموسومية والتي شملت الجسور الكروموسومية، الكروموسومات المتأخرة، الكروموسومات المكسورة، التكتل الكروموسومي، الكروموسومات الملتصقة، الطور التمهيدي المحبب، القطع الكروموسومية، الكروموسومات المشتتة، الكروموسومات المتعددة.

النتائج والمناقشة

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من نماذج البصل المعاملة بالمبيد (الديكلورفوس) أن للمبيد أثر كبير في عدد الإنقسامات الحاصلة في الخلايا و بالتالي على معامل الإنقسام و كذلك حث أنواع من التشوهات الكروموسومية Chromosome Aberrations بدرجة كبيرة عند المقارنة بالمجموعة السيطرة. لوحظ من الدراسة الحالية تأثر الخلايا المنقسمة معنوياً ($P< 0.01$) إذ يقل ظهورها كلما زاد تركيز المبيد Dichlorvos مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة، هذا مما أدى إلى التأثير على ظهور الأطوار حيث تأثرمعنوياً ($P< 0.01$) إذ وجد أنه كلما زاد تركيز المبيد Dichlorvos قل ظهورها، مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي أظهرت أكبر معامل إنقسام خيطي كما موضح في الجدول (1 و2)، إذ نجد إنعكاس عدد الخلايا المنقسمة على معامل الإنقسام الخيطي فكلما زاد تركيز المبيد Dichlorvos أدى الى انخفاض معامل الانقسام الخيطي وكذلك لمجموعة السيطرة الموجبة ومقارنة مع السيطرة السالبة التي أظهرت أكبر معامل إنقسام خيطي كما هو موضح في الأشكال (1 و 2)، ويرجع السبب في تدهور نشاط الإنقسام الخيطي نتيجة منع أو تمثيل البروتين (6)، ومن ناحية اخرى بسبب انخفاض الأكسدة الفوسفاتية أي إنخفاض ATP في الخلية والذي قد يكون العامل الآخر في منع تضاعف المادة الوراثية في النباتات المعاملة بالمبيدات (3) .

تؤثر المبيدات داخل الخلية في إنتاج الإنزيمات أو فعلها أو تثبيط التغذيـة العكسية لها و بالتالي قد يكون سبباً في انخفاض دليل الانقسام الخيطي (18) ويمكن تفسير النتائج في إنخفاض معامل الإنقسام الخيطي نتيجة زيادة تركيز المبيد يؤدي إلى تغيرات خلوية وأنه يثبط نشاط الانقسامات الخيطية الغير طبيعية في القمم النامية لجذور (1، 4، 7). لقد أظهر المبيد Dichlorvos تشوهات كرومسومية تركيبية فقط إذ لم يلاحظ أي تشوهات عددية، وكما يلاحظ في الجداول (3 و4) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة التي لم تظهر أي تشوه فيحين نجد أن مجموعة السيطرة الموجبة قد أظهرت نفس التشوهات، ويلاحظ أن التشوهات كانت متذبذبة من حيث ظهورها عند المعاملة بالمبيد Dichlorvos ولجميع المعاملات.

وكما هو موضح في الأشكال (3، 4، 5، 6، 7، 8، 9، 10، 11) والبعض منها موضح في الصور التالية (1، 2، 3، 4) إن السبب في حدوث هذه التشوهات الكروموسومية في الخلايا المرستيمية إلى أنها حتوي على مجاميع من المادة الوراثية موزعة على الخلية من النواة و لمايتوكوندريا والبلاستيدات مما يؤدي إلى حدوث إضطرابات في أكثر من فعالية من فعاليات الخلايا والتي تترجم على شكل تشوهات وراثية (15 و16). من ناحية أخرى يلاحظ أن التشوهات الكروموسومية التي تحث بالعديد من العوامل سواءاً كانت فيزياوية أو كيمياوية يمكن أن تنتج عن حدوث كسور في أحد أشرطة المادة الوراثية أو الشريطين معاً

والأخيرة تعد مهمة لأنها توضح قوة العامل المؤثر وعندما تقوم الخلايا بعمليات الإصلاح للمناطق المعطوبة يمكن أن يؤدي هذا إلى تشوهات (17). يمكن الاستنتاج ان المبيد سبب تشوهات وراثية وخلوية وثبط معامل الانقسام الخيطي واظهر عدة اشكال من التشوهات لاسيما مع زيادة التركيز .لذا ينصح باستخدامه بتراكيز اقل من3. مل/ لتر.

جدول (1): تأثير السيطرة السالبة (ماء مقطر) والسيطرة الموجبة (السايكلوفوسفامايد) على عدد الخلايا في الأطوار ومعامل الإنقسام الخيطي في الخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل لمدة 48 ساعة

المعاملة	التركيز (m/L)	العدد الكلي للخلايا	العدد المنقسم للخلايا	الطور التمهيدي	الطور الإستوائي	الطور الإنفصالي	الطور النهائي	معامل الانقسام الخيطي
السيطرة السالبة (ماء مقطر)	0	5000	2465.0 ± 95.5[a]	13.83±5.30 [d]	14.00±2.280 [d]	10.67±5.61[C]	10.83±4.62 [C]	6.428±2.533[c]
السيطرة الموجبة (السايكلوفوسفامايد)	5	5000	135.50±52.592 [b]	35.17±20.99 [c]	36,83±23.06 [c]	32.17±20.43 [b]	31.33±15.06 [b]	17.43± 0.689 [b]

جدول (2): تأثير المبيد الحشري الديكلورفوس على عدد الخلايا في الأطوار ومعامل الإنقسام الخيطي في الخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل لمدة 48 ساعة.

التركيز (m/L)	العدد الكلي للخلايا	العدد المنقسم للخلايا	الطور التمهيدي	الطور الإستوائي	الطور الإنفصالي	الطور النهائي	معامل الانقسام الخيطي
0.1	5000	358.50±132.38[b]	127.00±55.75[a]	95.83±30.0[a]	72.83±31.73[a]	62.83±31.66[a]	43.39±12.718[a]
0.2	5000	315.0±76.30[b]	79.00±29.72[b]	75.33±51.60[a,b]	99.00±74.05[a]	61.67±26.69[a]	38.112±9.300[a]
0.3	5000	156.33±58.61[b]	50.67±26.81[b,c]	51.00±24.18[b,c]	34.00±14.84[b]	32.67±26.41[b]	19.450±7.348[b]
0.4	5000	155.50±41.75[b]	46.17±26.78[b,c]	38.50±20.56[c]	38.17±18.45[b]	32.87±21.68[b]	19.259±6.041[b]
L.S.D.		86.1	36.8	37.0	40.0	12.6	12.8

جدول (3): التشوهات الكروموسومية للخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل لمجوعتي السيطرة السالبة (ماء مقطر) والسيطرة الموجبة (السايكلوفوسفومايد) لمدة 48 ساعة.

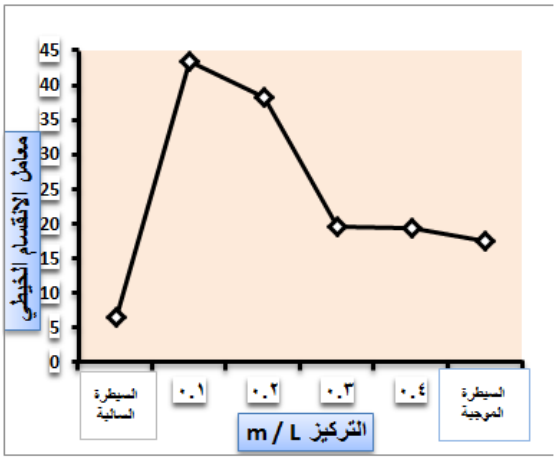
المعامله	التركيز	العدد الكلي للخلايا	العدد المنقسم للخلايا	جسور كروموسومية	كروموسومات متاخرة	كروموسومات مكسرة	تكتل كروموسومي
السيطرة السالبة (ماء مقطر)	0	5000	2465.0 ± 95.5[a]	00±000 [c]	00±000 [b]	00±000 [b]	00±000 [c]
السيطرة الموجبه (السايكلوفوسفامايد)	5 g/l	5000	135.50±52.592[a]	2.67±1.528[a]	3.80±2.683[a]	3.00±1.581[a]	3.00±1.155 [a]

قطع كروموسومية	كروموسومات متعددة	كروموسومات مشتته	طور تمهيدي محبب	كروموسومات ملتصقة
00±000[c]	00±000[b]	00±000[c]	00±000[c]	00±000
3.50±707[a]	1.75±957[a]	2.67±2.082[a]	2.33±1.528[a]	1.00±000

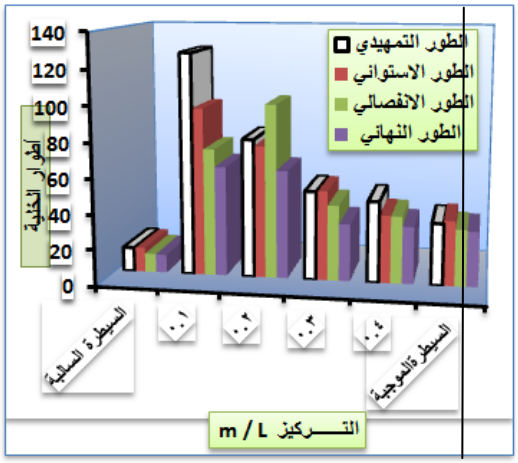
جدول (4): التشوهات الكروموسومية للخلايا المرستيمية لجذور نبات البصل المعاملة بالمبيد الحشري (الديكلورفوس) لمدة 48 ساعة.

التركيز	العدد الكلي للخلايا	العدد المنقسم للخلايا	جسور كروموسومية	كروموسومات متاخرة	كروموسومات مكسرة	تكتل كروموسومي
0.1	5000	358.50±132.38	1.83±1.472[a]	2.33±2.160[a,b]	2.33±3.011[a]	1.83±1.329[b]
0.2	5000	315.00±76.307	1.83±2.317[a]	1.67±1.966[b]	0.83±0.983[b]	1.00±1.265[b,c]
0.3	5000	156.33±58.613	1.00±1.265[b]	1.33±1.506[b,c]	0.33±0.516[b]	1.33±1.506[b]
0.4	5000	155.50±41.755	1.17±1.169[b]	0.33±0.516[c]	0.33±0.516[b]	0.33±0.516[c]
	L.S.D.		1.5	1.6	1.5	1.3

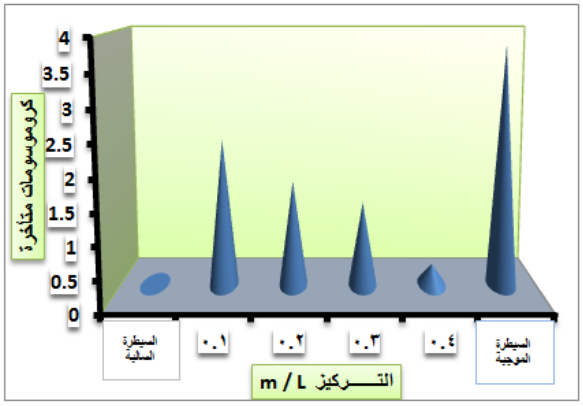
قطع كروموسومية	كروموسومات متعددة	كروموسومات مشتتة	طور تمهيدي محبب	كروموسومات ملتصقة
1.50±2.345[b]	1.17±1.602[a]	1.17±1.329[b]	1.50±1.378[b]	0.67±0.816
0.67±1.211[b]	0.67±1.211[a]	0.50±0.837[b]	1.00±0.894[b]	0.67±0.816



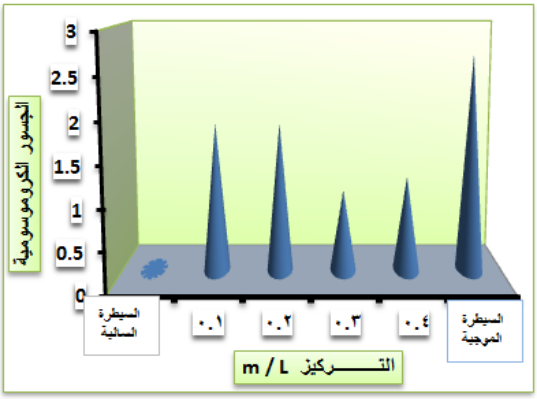
شكل (1): معامل الانقسام الخيطي باستخدام المبيد الحشري



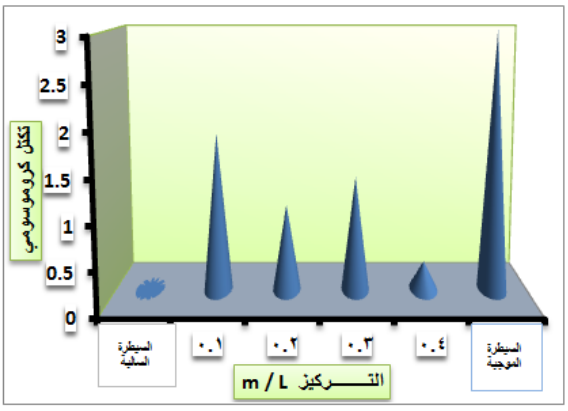
شكل (2): أطوار الخلية باستخدام المبيد الحشري



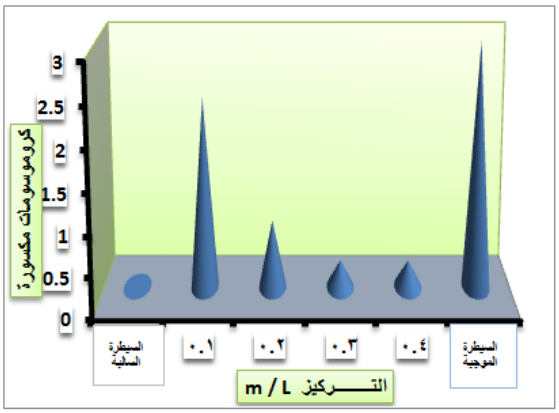
شكل (3): كروموسومات متأخرة باستخدام المبيد الحشري



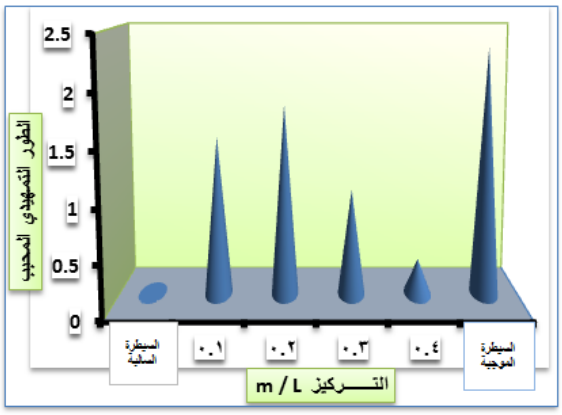
شكل (4): الجسور الكروموسومية باستخدام المبيد الحشري



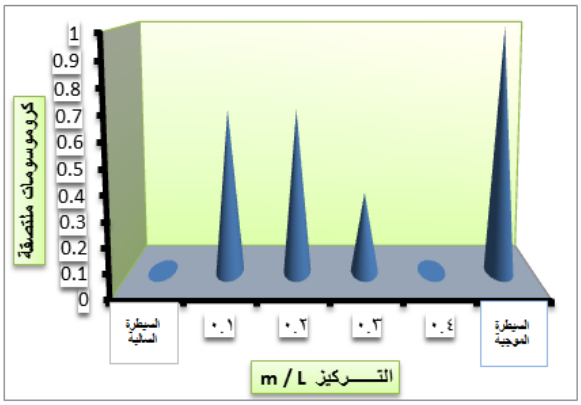
شكل (5): تكتل كروموسومي باستخدام المبيد الحشري



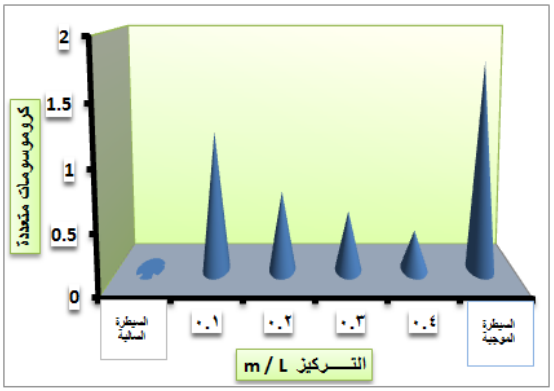
شكل (6): كروموسومات مكسورة باستخدام المبيد الحشري



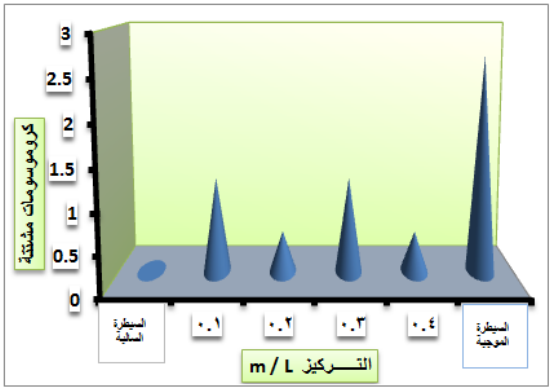
شكل (7): الطور التمهيدي المحبب باستخدام المبيد الحشري



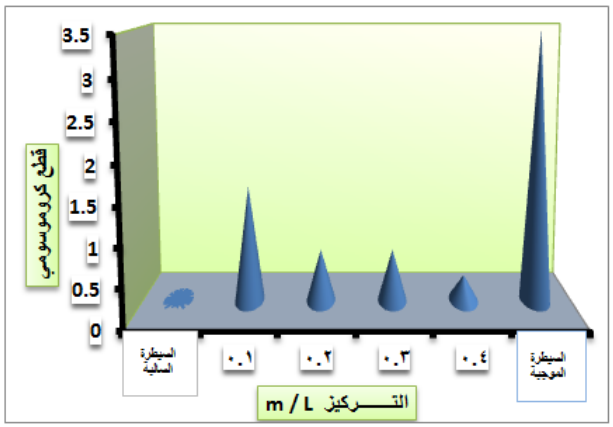
شكل (8): كروموسومات ملتصقة باستخدام المبيد الحشري



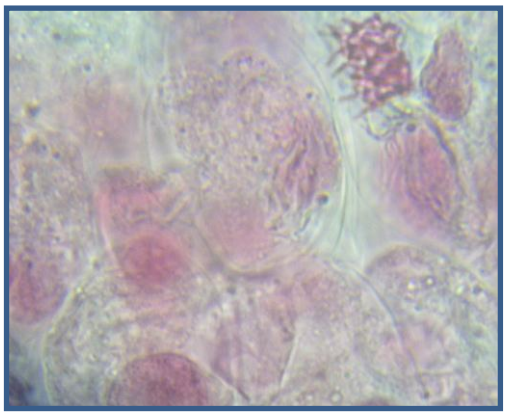
شكل (9): كروموسومات متعددة باستخدام المبيد الحشري



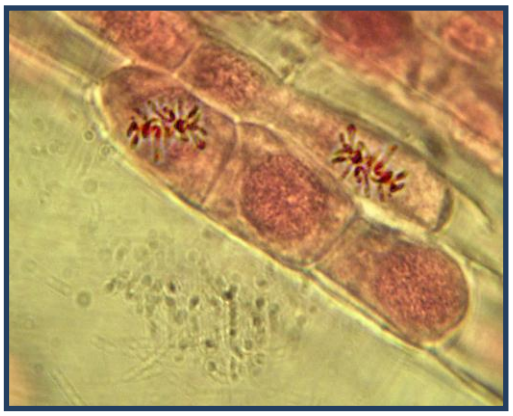
شكل (10): كروموسومات مشتتة باستخدام المبيد الحشري



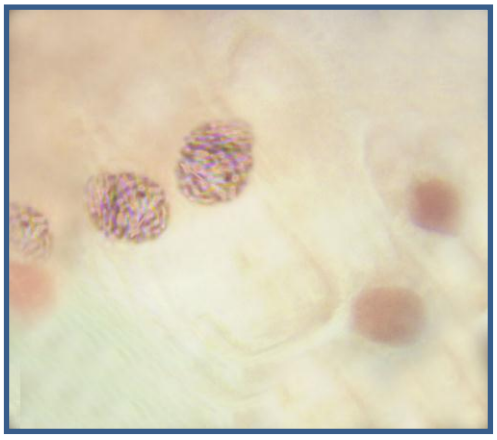
شكل (11): قطع كروموسومي باستخدام المبيد الحشري



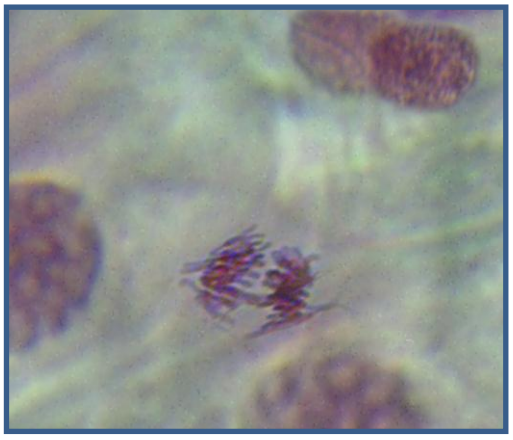
صورة (1): تشوه كروموسومي (تكتل كروموسومي) للمبيد الحشري بقوة تكبير 500X



صورة (2): تشوه كروموسومي (كروموسومات ملتصقة) للمبيد الحشري بقوة تكبير 500X



صورة (3): تشوه كروموسومي (طور تمهيدي محبب) للمبيد الحشري بقوة تكبير 500X



صورة (4): تشوه كروموسومي (جسور كروموسومية مزدوجة) للمبيد الحشري بقوة تكبير 500X

المصادر

1- Aaron, C.K. (2001). Organophosphate and carbamate. In: Ford, M. D.; Delaney, K. L.; Ling, L.J. and Ericson, T. (eds). Clinical Toxicology. WB Saunders Company; Philadelphia: 819 - 828.

2- Ajay, K. J. and Sarbnoy, R. K (1988). Cytogenetic studies on the effect of some chlorinated pesticides. Cytologia, 53: 427 – 436.

3- Chand, S. and Rays, C. (1981). Effect of herbicide 2,4- dinitroph-enol on mitosis , DNA, RNA and protein synthesis in Nigella sativa. Biol. Plant, 24: 198 – 202.

4- El-Khodary, S.; Habib, A. and Hakiem, A. (1989). Cytological effects of the herbicide Garlon- yon root mitosis of Allium cepa. Cytologia, 55: 209 – 215.

5- Internet: http://www. Reefnet. Gov. accessed 2011-3-1

12- Rank, J. (2003). The method of Allium anaphase - Telophase chromosome aberration assay. Ekologia, 1: 38 - 42.

13- Stich, H. F. and San, R. H. (1981). Topics in environmental physiology and medicine in (short - term tests fort chemical carcinogens) springer verge, New York, P. 187 – 199.

14- Sugimura, T.; Kondo, S. and Taketa, H. (1982). Environmental chromosome aberration assay. Ekologia, 1 (38 – 42). mutagens and carcinogens. University of Tokyo Press and Alan Rliss Inc. New York.

15- Weaver, R. F. and Hedrick, P. W. (1989). Genetics. W. M. C. Brown Publisher Dubuque, Iowa(USA), pp. 56.

16- WHO (1985). The environmental health criteria series "Mutagenic and Carcinogenic chemicals Guide to short – term tests for detecting", No. 5: 130.

17- Wolff, S. (1980). Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and the lesions that produce them. In "sister chromatid exchange" Ed. S. Wolff. Wiley – Inter science: New York - ch3. 41 - 57.

18- Wuu, K. D. and Grant, W. F. (1967). Morphological and somatic chromosomal aberrations induced by pesticides in meiotic cell of Barley (*Hordeum vulgare*). Genet. Cytol., 8: 481.

6- Kim, J. C. and Bendixen, E. L. (1987). Effect of haloxyfo P and CGA- 82725 on cell cycle and cell division of oat (Arena stiva) root tips. Weed Sci., 35: 769 – 774.

7- Lamsal, K.; Chimire, B. K.; Sharma, P.; Ghimiray, A. K.; Kim, S. W.; Yu, C. Y.; Chung, M.; Lee, Y. S.; Kim, J. S. and Ratna, S. (2010). Genetoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of Allium cepa L. Africa J. of Biotech., 9 (27): 4204 – 4210.

8- Lim, L. O. C. N.; Aldous, C. N.; Morris, S. R.; Gee, J. F.; Fong, H. R.; Formoli, T. A.; Rech, C. J. and Pfeifer, K. F. (1996). Dichlorvos (DDVP) risk characterization document. January 19th, 1996 Medical Toxicology and Water Health and Safety Branches, Department of Pesticides Regulation, California Environmental Protection Agency, Sacrameto, C. A.

9- Michael, E.; Nick, A. B.; Peter, E. and Andrew, H. D. (2008). Management of acute organ phosphorous pesticide poisoning. Lancet., 16: 371 (9612): 597 – 607.

10- Nielson and Rank J. (1994). Screening of toxicity and genotoxicity in waste water by the use of Allium test. Hereditas, 121: 249-254.

11- Rachel Carson Council (1998). Basic guide to pesticides: their characteristic and hazards.

Basrah J. Agric. Sci. 2012, 25(1): 50-58

Study of the Genotoxic and Cytotoxic effects of the insecticide Dichlorovos in roots of *Allium cepa* L.

Faizah AW Ahmed and Noor Hamid
Department of Biology, College of Education, University of Basrah

Abstract. The study was carried out to investigate the effect of different concentrations of the insecticide Dichlorovos ($C_4H_7CL_2O_4P$) in the root tips meristematic cells of *Allium cepa* using different concentrations 0.1,0.2,0.3 and 0.4 ml/l. The chromosomal aberrations types and the mitotic index studied. The increased concentrations of Dichlorovos caused significant decrease of the number of dividing cells and phases in comparison with the control group and that leads to drastic effect on the mitotic cells. The insecticide induced different types of chromosomal aberrations (chromosomal bridges, late chromosomes and broken bridges) significantly ($p<0.5$) using the concentrations 0.1, 0.2 ml/l and the positive control, on the other hand the concentrations 0.3,0.4 ml/l showed the least aberrations, whereas the positive control induced chromosomal fragments, lagging chromosomes and granular prophase in comparison with the other insecticide concentrations.

Key Words: Cytotoxicity, Mitosis, Dichlorovos.