

تقييم التأثيرات الجزيئية للسماق على الكبد

والكلى لذكور الفئران البيض السويسرية

Assessment of molecular effects of on

Rhuscoriaria on the liver and kidney of Male

Swiss Albino Mice (MusMusculus)

سلمى زهير عبد الله

أ.د. عزيز حميد رشيد

أ.م. عدنان فاضل نصيف العزاوي

جامعة تكريت - كلية العلوم - قسم علوم الحياة

Salma zher Abdulla

Pro.Dr. Aziz Khalid Hamid

Asst.Prof. : Adnan Fadhil Al_Azaawie

Aziz k. Hameed

Department of Biology / College of Science

University of Tikrit

الخلاصة

هدف هذه الدراسة تقييم تأثير المستخلص المائي للسماق على الحمض النووي منقوص الأوكسجين ال (DNA) للكبد والكلية لذكور الفئران البيض السويسرية باستخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا ال (RAPD). استخدمت ثلاثون فأرة، قسمت الى ستة مجاميع لكل مجموعة خمس فئران، المجموعة الاولى مجموعة السيطرة وقد جرعت بالماء، أما المجموعة الثانية، الثالثة، الرابعة، الخامسة، والسادسة فجرعت بالسماق بتركيز (١٠٠، ٥٠، ٣٠، ٢٠، ٦، ٢٥ ملغم /كغم) على التوالي لمدة إحدى عشر يوماً. خدرت الحيوانات ثم شرحت للحصول على عينات الكبد والكلية

لاستخلاص ال (DNA) منها، والذي ضخم باستعمال تقنية ال RAPD مع اثنا عشر بادئ عشرية القواعد عشوائية التعاقب. اظهرت النتائج ان التعرض للسماق بتراكيز مختلفة قد اثر على الحمض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) لخلايا الكبد والكلية للفئران وسبب تغيرات كبيرة في انماط تقنية ال RAPD بالمقارنة مع مجموعة السيطرة من ناحية الاختلاف في عدد الحزم واحجامها وشدتها. لذلك يمكن القول ان استعمال السماق بتراكيز عالية يمكن ان يؤثر على الحمض النووي منقوص الاوكسجين ال (DNA) وقد يؤدي الى حصول طفرات مضره كما ان تقنية ال RAPD مفيدة جداً في الكشف عن تأثير المواد الكيميائية على المستوى الجزيئي.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the water extract on the DNA of the liver and kidney of male Swiss white rats by using the polymorphic randomization technique of the RAPD. Thirty groups of mice were divided into six groups for each group of five mice. The first group was the control group and was injected with water. The second group, the third, fourth, fifth, and sixth groups were activated with concentrations of 6.25,20,30,50,100 mg / kg respectively Eleven days. The animals were anesthetized and then explained to obtain liver and kidney samples to extract DNA from them, which was amplified using the RAPD technique with twelve decimal bases. The results showed that exposure to the sumac at different concentrations affected the DNA of the liver and kidney cells of the mice and caused significant changes in the patterns of RAPD technique compared with the control group in terms of the difference in the number, size and intensity of the beams. Therefore, it can be said that the use of high concentrations of sumac can affect DNA, which may lead to

harmful mutations, and RAPD is very useful in detecting the effect of chemicals at the molecular level.

المقدمة

أخذ الاهتمام بالنباتات الطبية يزداد تدريجياً في الآونة الأخيرة في الدول الصناعية وكذلك في البلدان النامية {١}،، ومنها نبات السماق الذي عرف منذ زمن طويل ووجد ما يقارب (120) نوعاً" منه منتشرة تلقائياً في الأراضي الكلسية الجافة أو الطينية الكلسية في المناطق الحارة، يختلف التركيب الكيميائي للسماق حسب نوع السماق ومصدره واليه ترجع سميته والصمغية ورائحته الراتنجية الخاصة به، هذا علماً أن نسبة التركيب تتغير تبعاً لأجزاء النبات نفسه {٢}. نبات السماق من النباتات ذوات الفلقتين (Dicotyledonea) يعود إلى الفصيلة البطمية (Terebinthaceae) يكون بشكل أشجار أو شجيرات صمغية راتنجية ونظراً لوجود العديد من المركبات الفعالة في فقد أجريت عليه العديد من البحوث والدراسات{٣}.

لقد زاد الاهتمام في الآونة الأخيرة بالبحوث التي تحاول الكشف عن عوامل السمية الوراثية الموجودة في البيئة. ونتيجة القلق المتزايد لدى عامة الناس والحكومات من تأثير تلك المواد من ناحية ولكون القياسات الكيميائية المباشرة لتلك العوامل وتفسير مثل هذه القياسات صعبة نوعاً" ما من ناحية أخرى أصبح من الضروري استخدام طرائق حساسة وفعالة للكشف عن أضرار تلك المواد التي يصعب قياسها بالطرق الاعتيادية {٤}. فعندما تتعرض الكائنات الحية باستمرار إلى المواد ذات القدرة التطهيرية (المواد المطهرة) فإن ذلك قد يؤدي إلى تلف الحمض النووي، لقد استخدمت بعض الطرق المختبرية على نطاق واسع للكشف عن تأثير تلك المواد إلا أن التقنيات الجزيئية تعتبر أفضل تلك الطرق لأنها تعطي صورة مباشرة عن تأثير تلك المواد على مستوى الدنا {٥}. ومن تلك التقنيات تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا ال Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) التي

تعد احدى مؤشرات ال DNA المعتمدة على تقنية ال تضاعف البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction (PCR) والتي ساعدت في تحديد تغيرات الدنا بعد التعرض لعوامل السمية الوراثية {٦}. حيث ادى استعمال تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدن اكمؤشرات وراثية إلى تحسين الكشف عن تعديلات الحمض النووي بعد تأثير العديد من العوامل {٧} اذ تم الكشف عن أنواع مختلفة من أضرار الحمض النووي عن طريق تلك التقنية، فهي من الناحية العملية بسيطة، رخيصة نسبياً، سريعة وتعطي معلومات عن عدد كبير من المواضيع {٨}. تمثل التغييرات التي تحدث في نمط تقنية الدنا المتعدد بعد المعاملة او التعرض للمواد المطفرة التغير في كثافة الحزمة بالإضافة الى فقدان او ظهور حزم جديدة وذلك من خلال مقارنة نمط تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا بين العينات المعاملة او المتعرضة للمطفرات ومجموعة السيطرة او غير المتعرضة للمطفرات {٩} لذلك اجريت هذه الدراسة لتقييم تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للسماق على الحمض النووي منقوص الأوكسجين ال (DNA) للكبد والكلية لذكور الفئران البيض السويسرية باستخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال لسلسلة الدنا ال (RAPD).

المواد وطرق العمل

استخدمت في هذه الدراسة ثلاثين فاراً من الذكور البيض السويسرية تبلغ أوزانهم (٢٣-٢٧) غم وعمرها تراوح بين (٨-١٠) أسابيع تم الحصول عليها من المركز الوطني للبحوث/ بغداد. وتم حفظ كل خمسة فئران في قفص بلاستيكي في البيت الحيواني في كلية الطب البيطري/جامعة تكريت، فرشت الأقفاص بنشارة الخشب مع تبديل نشارة الخشب كل أسبوع مع ضبط درجة حرارة الغرفة بمقدار 25 ± 2 درجة مئوية، استخدمت لتغذية الحيوانات العليقة المتكونة من ٣٥ % حنطة ، ٣٣ % ذرة صفراء ، ٢٠ % فول الصويا ، ١٠ % بروتين حيواني ، ١ % حليب مجفف مضافاً

إليها ١ % من كل من الفيتامينات والأملاح المعدنية، وتم الاحتفاظ بالفئران لمدة أسبوع واحد قبل التجربة للتكيف.

تحضير المستخلص المائي للسماق:

تم تحضير المستخلص المائي للسماق حسب ما ذكره {١٠} وذلك بأخذ ٥٠ غم من المسحوق الجاف من النبات بعد طحنه ووضعه في دورق زجاجي سعته ١٠٠٠ مل يحتوي على ٥٠٠ مل من الماء المقطر المعقم ثم وضع الدورق على سخان معدني مغناطيسي بدرجة ٥٠م وترك ليمتزج جيداً لمدة ٢٤ ساعة بعدها رشح المحلول باستخدام طبقات عدة من الشاش الطبي اولاً ثم باستخدام أوراق الترشيح، ترك الراشح في فرن كهربائي بدرجة ٥٠م الى ان جف ثم حفظ المسحوق الناتج بعد وزنه في الثلاجة.

تحديد الجرعة الفعالة:

لغرض تحديد الجرعة الأكثر تأثيراً للمستخلص المائي للسماق المستخدم في هذه الدراسة قسمت الحيوانات السليمة عشوائياً الى ست مجاميع ضمت كل مجموعه خمسة حيوانات ورتبت كالاتي:

١. المجموعة الأولى: اعتبرت كمجموعة سيطرة Control تم تجريعها بالماء المقطر والعليقة فموياً لمدة احد عشر يوماً.
٢. المجموعة الثانية: أعطيت المستخلص المائي للسماق بتركيز ٦,٢٥ ملغم /كغم من وزن الجسم فموياً لمدة احد عشر يوماً ومثلت الجرعة تحت العلاجية.
٣. المجموعة الثالثة: أعطيت المستخلص المائي للسماق بتركيز ٢٠ ملغم /كغم من وزن الجسم فموياً لمدة احد عشر يوماً ومثلت الجرعة العلاجية.
٤. المجموعة الرابعة: أعطيت المستخلص المائي للسماق بتركيز ٣٠ ملغم /كغم من وزن الجسم فموياً لمدة احد عشر يوماً ومثلت الجرعة فوق العلاجية.

٥. المجموعة الخامسة: أعطيت المستخلص المائي للسماق بتركيز ٥٠ ملغم /كغم من وزن فمويا لمدة احد عشر يوماً الجسم ومثلت الجرعة السامة.
٦. المجموعة السادسة: اعطيت المستخلص المائي للسماق بتركيز ١٠٠ ملغم /كغم من وزن الجسم فمويا لمدة احد عشر يوماً ومثلت الجرعة القاتلة.

تشريح الحيوانات وعزل الـDNA:

نقلت الحيوانات الى عبوة مغلقة تحتوي على الكلوروفورم، بعد تخديرها بشكل تام شرحت للحصول على الكبد والكلى ثم غسلت هذه الأنسجة بالمحلول الفسلجي Normal saline ونقلت الى المختبر لعزل الـ DNA منها. استخلص الـDNA من عينات الكبد والكلى باستخدام النتروجين السائل وحسب الطريقة التي ذكرها {١١}، قدرت كمية الدنا الـ DNA ونقاوته بالاعتماد على قراءة الامتصاص لطيف الأشعة فوق البنفسجية عند الطول الموجي ٢٦٠ و ٢٧٠ نانوميتر باستخدام جهاز (Nanodrop)، خففت العينات للحصول على تركيز (٢٥ نانوغرام) لكل مايكروليتر وهو التركيز المناسب لإجراء تفاعلات تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD).

تحضير تفاعلات الـ RAPD :

أجريت تفاعلات تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) وفقاً لما ذكره {١٢} استعمال بادئات عشوائية (جدول رقم ١) باستخدام العدة (GoTaq Master Green) المجهزة من شركة (Promega, USA). أجريت بعض التجارب الأولية للوصول الى التركيز الأمثل للبادئات المستخدمة والدنا القالب الذي يعطي أفضل نتيجة للتضاعف. لكل عينة من عينات الدراسة استخدمت انبوبة اختبار بحجم (0.2 ml) ووضع فيها (١٠ مايكروليتر) من خليط التفاعل الأساسي الذي يحتوي على المكونات الأساسية لتفاعل البلمرة المتسلسل ثم أضيف إليها الدنا القالب بتركيز (١٠٠ نانوغرام)

والبادئ بتركيز ١٠ بيكومول/ مايكرو لتر ثم أكمل حجم التفاعل بالماء المقطر المعقم الى ٢٠ مايكرو لتر ومزجت مكونات التفاعل جيدا ثم وضعت الأنابيب في جهاز ال Thermocycler بعناية لإنجاز التفاعل التضاعفي بعد أن تمت برمجته حسب البرنامج: دورة واحدة لمدة ٥ دقائق على درجة حرارة ٩٤م° للمسخ الأولي لشريط الدنا تليها ٤٠ دورة تضاعف تتضمن كل دورة دقيقة على درجة ٩٤م° لمسح قالب ودقيقة واحدة على درجة ٣٦م° لربط البادئات بالدنا القالب ودقيقة واحدة على درجة حرارة ٧٢م° للاستطالة مع دورة أخيرة لمدة ١٠ دقائق على درجة ٧٢م° للاستطالة النهائية. حضر هلام الأكاروز بتركيز ٢% ثم أضيف (٥ مايكرو لتر من صبغة Red Save) قبل صب الهلام في حوض الترحيل، رحلت نواتج التضخيم على مع الدليل الحجمي (DNA Ladder) لمدة ٩٠ دقيقة بمقدار (٣ فولت/ سم) ثم فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV-Light) وصور باستخدام (Gel Documentation System) {١٣}.

تسجيل نتائج الRAPD:

سجلت نتائج تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) بفحص صور أنماط الترحيل الكهربائي لكل بادئ وتسجيل الحزم (Bands) ثم مقارنة نتائج العينات المعاملة بالسماك مع مجموعة السيطرة بالاعتماد على ظهور حزم جديدة او اختفاء حزم كانت موجودة بالإضافة الى الاختلاف في شدة تألق الحزم (Intensity) التي تنتج من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معا" بنفس الوزن الجزيئي مما يؤدي الى ظهورها بشكل حزمة واحدة سميكة والتي قد تنتج من حالة homozygosity اذ يتم فيها تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر وكونها بنفس الوزن الجزيئي تتجمع القطع المتضاعفة معا {١٤} ثم حسب العدد الكلي لحزم ال RAPD التي اظهرها كل بادئ للعينات المدروسة وتحديد الحزم المتباينة (Polymorphic) والمتطابقة (Monomorphic) كما تم حساب النسبة المئوية للحزم المتباينة، كفاءة البادئ والقوة التمييزية حسب ما ذكره {١٥} لكل بادئ كما في الجدول (٤-٢).

النتائج والمناقشة

أجريت هذه الدراسة للكشف عن تأثير السماق على المادة الوراثية الدنا (DNA) للعينات المأخوذة من كبد وكلية لذكور الفئران البيض السويسرية باستخدام تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD)، إذ تم إعطاؤها السماق بتركيز (١٠٠، ٥٠، ٣٠، ٢٠، ٢٥، ٦ ملغم) ومقارنة نتائج تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) للعينات المأخوذة من الحيوانات المعاملة بالسماق مع غير المعاملة (السيطرة). تم الحصول على نتائج جيدة بعد إجراء بعض المحاولات للوصول إلى الظروف المثلى وحلت نتائج تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) بالاعتماد على ظهور حزم جديدة أو اختفاء حزم كانت موجودة والنتيجة من تضاعف قطع معينة من جينوم الحيوانات المستخدمة وعلى الاختلاف في شدة تآلق الحزم (Intensity).

استخدم في هذه الدراسة اثنا عشر بادئاً "عشوائياً" لإنجاز تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) والمبينة أسماؤها وتسلسلاتها في الجدول رقم (١)، سبع منها أعطت نتائج تضاعف مختلفة بينما لم تعطي الخمسة الأخرى اي نتيجة.

جدول رقم (١): يبين التسلسل النكليوتيدي للبادئات

المستخدمة في تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) :

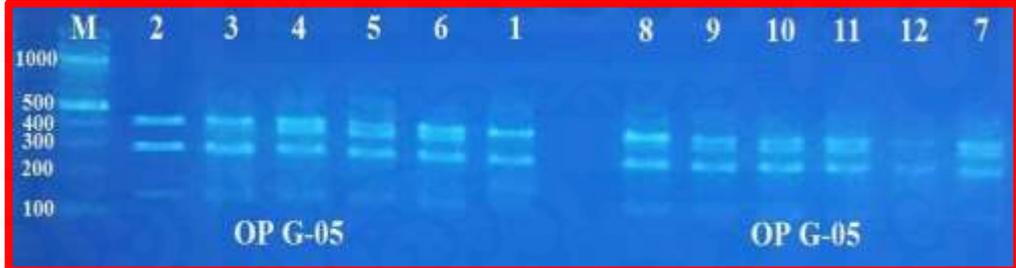
ت	اسم البادئ	التسلسل النكليوتيدي 3 - 5
١	OP G-05	CTGAGACGGA
٢	OP H-14	ACCAGGTTGG
٣	OP M-01	GTTGGTGGCT

GACAGGAGGT	OP O-11	٤
GTGTCTCAGG	OP P-04	٥
TCTGTCCGGTC	OP Q-02	٦
CCATTCCCCA	OP R-10	٧
CAGCATGGTC	OP V-20	٨
TCACCAGCCA	OP U-12	٩
GTCCTGGGTT	OP W-17	١٠
AGAGCCGTCA	OP Y-07	١١
GGGTGGGTAA	OP Z-08	١٢

بعض البادئات التي استخدمت لم يُعط أية نتيجة بالرغم من إعادتها أكثر من مرة وهذا قد يعود الى غياب المواقع المكملة لتسلسلات تلك البادئات ضمن جينوم الحيوان المستخدم، اما البادئات التي اعطت نتائج تضاعف مختلفة فتم تفسير نتيجة كل بادئ على حدة اعتمادا" على وجود او غياب حزم الدنا (DNA) المتضاعفة، الاختلاف في الكثافة بين الحزم والاختلاف في عددها وأوزانها الجزيئية باختلاف البادئ المستخدم والنتيجة من الاختلاف في عدد المواقع المكملة لذلك البادئ في جينوم كل عينة من العينات المعرضة لمعاملات السماق في هذه الدراسة وهذا يتفق مع أغلب الدراسات التي استخدمت تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD لتقييم تأثير المواد على الدنا للكائن الحي المستخدم سواء اكان حيوانا ام نباتا وحتى البكتريا والفقارية {١٦}، {١٧}، {١٨}.

أظهرت صور الترحيل الكهربائي لنتائج تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) اختلافا" واضحا" في عدد حزم الدنا (DNA) المتضاعفة وتباينا" واضحا"

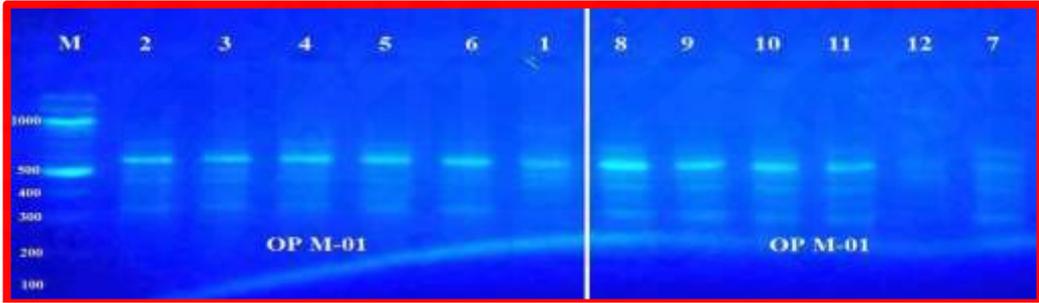
في اوزانها الجزيئية حسب البادئ المستخدم حيث أعطت البادئات التي أظهرت نتائج ٢٣٤ حزمة كعدد كلي كما في الأشكال (١، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧).



الشكل (١): الترحيل الكهربائي لنتائج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP G-05 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧- سيطرة، الكلية (٧- سيطرة، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢ المعاملات)



الشكل (٢): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP H-14 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧- سيطرة، الكلية (٧- سيطرة، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢ المعاملات)



الشكل (٣): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP M-01 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢,٣,٤,٥,٦, المعاملات)، الكلية (٧- سيطرة، ٨,٩,١٠,١١,١٢ المعاملات).

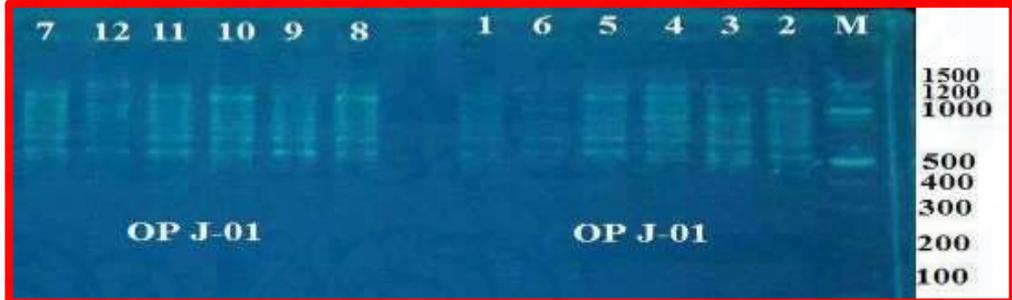


الشكل (٤): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP Y-07 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢,٣,٤,٥,٦, المعاملات)، الكلية (٧- سيطرة، ٨,٩,١٠,١١,١٢ المعاملات).

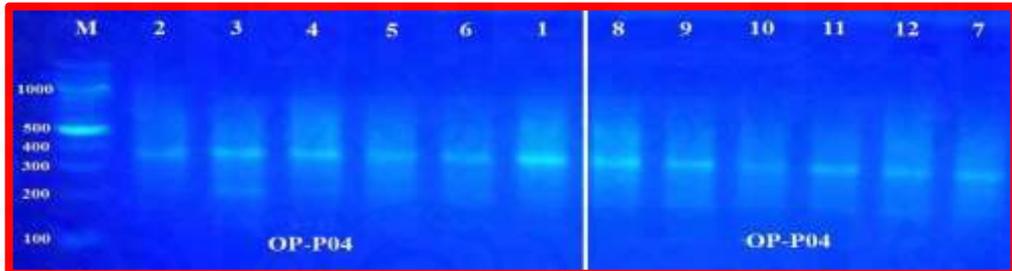


الشكل (٥): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP Z-08 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder

(100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧) المعاملات، الكلية (٧- سيطرة، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢) المعاملات).



الشكل (٦): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP J-01 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧) الكلية (٧- سيطرة، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢) المعاملات).



الشكل (٧): الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR للبادئ OP P-04 المرحلة على هلام الاكاروز ١,٥% مع الدليل الحجمي DNA Ladder (100 bp) لعينات الكبد (١- سيطرة، ٢، ٣، ٤، ٥، ٦، ٧) الكلية (٧- سيطرة، ٨، ٩، ١٠، ١١، ١٢) المعاملات).

بينت نتائج تقنية التضاعف العشوائي لسلسلة الدنا RAPD-PCR اختلافات في عدد الحزم المتضاعفة اعتمدت طريقة تحليل نتائج الدراسة على وجود أو غياب الحزم الناتجة من تضاعف قطع معينة من جينوم العينات المستخدمة وعلى الأوزان الجزيئية لتلك الحزم التي تعتمد على العدد والمواقع المكملة لتسلسلات البادئات على شريط DNA القالب كما في الجدول رقم (٢). يعزى ظهور الحزم الجديدة إلى وجود مواقع oligonucleotide التي تصبح في متناول البادئ بعد التغيير الهيكلي أو لأن بعض

التغيرات في تسلسل الحمض النووي قد حدثت بسبب الطفرات (مما أدى إلى أحداث الصلب الجديدة) أو الحذف أو إعادة التركيب {١٩}.

جدول (٢): يبين الحزم الجديدة والغائبة لنتائج لتقنية التعدد العشوائي لسلسلة الدنا (RAPD) للبدانات التي أعطت نتائج:

اسم البدان ١	كبد										كلية									
	٢		٣		٤		٥		٦		٨		٩		١٠		١١		١٢	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
G-5	٤٠	٠	٤٠	٠	٤٠	٠	٧٠	٠	٠	٧٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	١٣	٠	١٣	٠	١٣	٠	٦٠	٠	٠	٦٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
H-14	٢٠	٦٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	١٤	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	٢٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
M-1	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠
	٤٥	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	٢٢	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Y-7	٧٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	٤٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
Z-8	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠	٨٠	٠
	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠	٤٨	٠
J-1	١٠	٥٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠	٠
P-4	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠	٢٨	٠
	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠	٢٢	٠

كما اعتمدت طريقة تحليل نتائج الدراسة على التباين المعتمد على الاختلافات في شدة (Intensity) تآلق الحزم التي تكون ناتجة عادة من ظهور بعض الحزم المتضاعفة معاً في الوزن الجزيئي نفسه فتظهر على شكل حزمة سميكة واحدة (في الحقيقة أكثر من حزمة (Comigrating bands) قد تكون ناتجة من حالة homozygote حيث يتم فيها تضاعف نفس الموقع على الاليل الآخر، وبما أنها بالوزن الجزيئي نفسه لذلك تتجمع القطع المتضاعفة في تلك المواقع معاً وأحياناً زيادة تركيز الدنا (DNA) القالب يؤدي إلى تكرار عدد نسخ DNA الهدف مما يؤدي الى تضاعف الموقع نفسه أكثر من مرة {١٤} ان التغيرات في كثافة الحزم واختفائها قد يكون راجعاً إلى التغيرات في مواقع oligonucleotide ويرجع ذلك أساساً إلى إعادة ترتيب الجينوم وقلة عرضة للطفرات أو تلف الحمض النووي في المواقع الارتباط {٢٠}

بعد تسجيل نتائج تقنية التضاعف العشوائي المتعدد الأشكال (RAPD) للبادئات التي أعطت نتائج تم تحديد العدد الكلي للحزم الناتجة والحزم المتباينة كما تم حساب النسبة المئوية للحزم المتباينة، كفاءة البادئ والقوة التمييزية حسب ما ذكره {١٥} لكل بادئ كما في الجدول (٣).

جدول (٣): يبين البادئات التي أظهرت نتائج لتقنية التعدد العشوائي لسلسلة الدنا متباينة مع عدد الحزم الكلية والمتباينة، كفاءة البادئ والقوة التمييزية (%) لكل بادئ:

ت	اسم البادئ	عدد الحزم الكلية	عدد الحزم المتباينة	النسبة المئوية للحزم المتباينة	كفاءة البادئ (%)	القوة التمييزية للبادئ (%)
١	OPG-05	35	35	100	14.95	20.11
٢	OP H-14	44	32	72.72	18.8	18.39
٣	OP M-01	34	22	64.7	9.4	12.64
٤	OP Y-07	35	23	65.71	14.95	13.21

10.34	12.82	60	18	30	OP Z-08	٥
16.09	17.09	70	28	40	OP J-01	٦
9.19	6.83	100	16	16	OP P-04	٧
			174	234	المجموع الكلي	

المصادر:.

- 1) Abere, T. A., Okoto, P. E., Agoreyo, F. O. (2010). Antidiarrhoea and toxicological evaluation of the leaf extract of *Dissotisrotundifolia* Triana (Melastomataceae). *BMC Complement Altern. Med.* 10: 71.
- 2) Lauk, L.; Caccamo, F.; Speciale, A. M.; Tempera, G.; Ragusa, S. and Pantle, G. (1998). Antibacterial activity of *Rhuscoriaria* L. leaf extract. *Microbial Intst. Catania. Italy.* 81: 95-124 .
- 3) Duke, J. A.; Jobogenschutz, G. M.; Ducellier, J. and Duke, K. (2003). *Handbook of Medical Plant* . CRC press, Boca Raton : 269-274. *ecotoxicology. Toxicol. Ecotoxicol. News Rev.,* 3: 110-114.
- 4) Lowry LK (1995). Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks. *Toxicol. Lett.* 77: 31-38.
- 5) Abdelmigid, Hala M.(2009). Risk Assessment of Food Coloring Agents on DNA Damage Using RAPD Markers. *The Open Biotechnology Journal*,3, 96-102.
- 6) Atienzar FA, Cheung VV, Jha AN, Depledge MH (2001). Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicol. Sci.* 59: 241–250.
- 7) Atienzar FA, Billinghamurst Z, Depledge MH (2002c). 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Env. Pollut.* 120: 735–738.
- 8) Fontaine, C., Lovett, P.N., Sanou, H., Maley, J., Bouvet, J.M. 2004. Genetic diversity of the shea tree (*Vitellariaparadoxa*C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity*, 93: 639-648.

- 9) Dongre A.B. (2009). Optimization of RAPD-PCR for discrimination of different strains of *Bacillus thuringiensis*. Romanian Biotechnological Letters Vol. 14, No. 2, pp. 4307-4312.
- 10) Harborne, J.B., (1984). Phytochemical methods. London Chapman and Hall Ltd., pp 49-188.
- 11) Pearson, H. and Stirling, D. (2003). PCR protocols: method in molecular biology. 2nd ed. Vol 226. Human Press.
- 12) Williams, J. G., Kubelic, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. nucleic acids Res. 18 : 6531-6535. 261: 47-58.
- 13) Sambrook, J., and Russel, D.W., (2001). Molecular cloning, a laboratory manual (3ed). Cold spring Harbor laboratory press, New York.
- ١٤) الحسني ، خلود إبراهيم حسن . ٢٠٠٢ . استخدام المؤشرات الجزيئية المعتمدة على التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا في دراسة التنوع الوراثي للبطاطا *Solanum tuberosum* L. أطروحة دكتوراه . كلية العلوم . قسم علوم الحياة . جامعة بغداد . ع ص ٢٠٠ .
- 15) Megha. Y. J. , Alagawadi, A. R. and Krishnaraj, P. U. (2007). Diversity of fluorescent pseudomonas isolated from the forest soils of the western Ghats of Uttara Kannada. CURRENT SCIENCE, Vol 93: No: 10.
- 16) Atienzar FA, Cordi B, Donkin MB, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH (2000). Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae, *Palmaria palmate*. Aquatic Toxicol. 50: 1-12.
- 17) Savva, D. 1998. Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effects. Exotoxicol. Environ. Safety, 41: 103-106.
- 18) Savva D, 1996. DNA fingerprinting as a biomarker assay in ecotoxicology [Jl. Toxicol Ecotoxicol News Rev, 3: 110-114].
- 19) Atienzar F, Conradi M, Evenden A, Jha A, Depledge M (1999). Qualitative assessment of genotoxicity using RAPD: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo(a)pyrene. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2275-2282.
- 20) Nelson, J.R., C.W. Lawrence and D.C. Hinkle. 1996. Thymine-thymine Newton, C. R., and Graham, G. A. (1997). PCR. 2nd. Edition Introduction to biotechniques. Information press, Eynsham, Oxon, UK.