التأثير التطفيري لمستخلص درنات نبات السعد *Cyperus rotundus* في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami*

هبة خالد محمود ، هناء رمضان عبد الكريم ، فادية موفق الحيالي ، ساهي جواد ضاحي

قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١٣ / ٤ / ٢٠٠٩ ، تاريخ القبول: ٢٥ / ٥ /٢٠١٠)

الملخص:

تضمن البحث الحالي دراسة التأثير التطفيري لمستخلص درنات نبات السعد *Cyperus rotundus* في الفطر *Aspergillus amstelodami*. ولهذا الغرض فقد اجريت اولاً تجارب لتحديد التركيز المثبط الادنى Minimum Inhibitory Concentration, MIC من المستخلص المائي والكحولي لدرنات السعد والذين يثبطان نمو الفطر. اظهرت التجارب ان المستخلص المائي قد اعطى تثبيطاً لنمو الفطر بنسبة ٢٦,٤٦% عند التركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/مل، في حين اعطى هذا التركيز من المستخلص الكحولي نسبة تثبيط اعلى اذ بلغت ٦٧,٥٦% من نمو الفطر. لذا اقتصر البحث الحالي على دراسة التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي فقط اذ جرى اختيار ثلاثة تراكيز تحت قاتلة وهي ٨٠٠ ، ٩٠٠ ، ١٠٠٠ مايكروغرام/مل ودرست قدرتها على حث طفرات مقاومة للمبيد الفطري البينوميل في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami* . من النتائج التي تم الحصول عليها تبين ان التراكيز المدروسة من المستخلص الكحولي لم يكن لها تأثير تطفيري على كونيدات هذا الفطر وذلك ضمن الظروف التجريبية الموصوفة في البحث الحالي.

المقدمة:

يعد السعد *Cyperus rotundus* من النباتات التي يستعملها الانسان كغذاء ودواء لعلاج اضطرابات المعدة والامعاء وله تأثير مسكن كما يستعمل في صناعة العطور. وهو من النباتات العشبية المنتشرة بالحقول والحدائق وعلى جوانب المجاري المائية وله اوراق طويلة دقيقة وجذور معمرة ذات درنات تنتشر تحت الارض [١ ، ٢ ، ٣]. يمتلك السعد الكثير من الفعاليات اذا اشارت بعض الدراسات الى ان المستخلصات المائية والكحولية وكذلك الزيوت الاساسية لدرنات السعد تمتلك فعالية مضادة للتطفير (Antimutagenic) وفعالية مضادة للأكسدة (Antioxidant) وكذلك فعالية في ازالة الجذور الحرة (Free radicals)، [٤]. ونظراً لتلك الفعاليات التي يمتلكها السعد وكذلك نتيجة لاستخداماته المتعددة وخصوصاً تناوله كغذاء لذا اصبح ضرورياً دراسة احد التأثيرات الوراثية المهمة التي من المحتمل ان يحدثها هذا النبات وهو التأثير التطفيري، اذ من الملفت للانتباه ان الغذاء الذي يتناوله الانسان يحتوي على العديد من المطفرات (Mutagens) او المسرطنات (Carcinogens) او كليهما [٥] ترتبط تلك المواد المطفرة او المسرطنة مع الجزيئيات الكبيرة في الخلية مثل الحوامض النووية DNA ، RNA والبروتينات مما يؤدي الى احداث الطفرات ومن ثم التحول الخلوي (Cellular transformation) والتغيرات الورمية [٦]. وبما ان معظم العوامل المسرطنة هي مطفرة ايضاً، لذا فان دراسة القابلية التطفيرية توفر كشفاً اولياً عن مخاطر تلك المواد [٧]. يهدف البحث الحالي الى دراسة التأثير التطفيري الذي يمكن ان يحدثه مستخلص درنات نبات السعد *C.rotundus* في الفطر *A.amstelodami* اذ تعتبر الفطريات كائنات حقيقية النواة يمكن التعميم منها الى الاحياء الراقية كالانسان مثلاً[٨].

المواد وطرائق العمل:

كائن الاختبار:

أجريت جميع التجارب على السلالة A1(*WAI*) من الفطر *A.amstelodami* وهي سلالة برية في جميع احتياجاتها الغذائية، ولكنها تحمل طفرة تلقائية تحيل اللون الاخضر البري لكونيدات هذا الفطر الى اللون الابيض[٩].

الأوساط الزرعية:

ان الاوساط الغذائية المستخدمة في تنمية الفطر *A. amstelodami* وظروف الزرع هي كما وصفها [٩]. اذ جرى استخدام وسطين اساسيين: الاول هو وسط الحد الادنى غير المعضد (Minimal medium, M)، اما الوسط الثاني فهو وسط مستخلص الشعير – ملح الطعام (Malt extract – Salt medium) واستخدم للحصول على اكبر عدد من الكونيدات. ولغرض الحصول على مستعمرات عديدة ومنفردة ولتسهيل عملية عدها يضاف الى الوسط الغذائي الملح Sodium deoxycholate (D) وبتركيز نهائي قدره ٤٠٠ مايكروغرام/مل من وسط النمو، فعند اضافة الملح (D) الى الوسط (M) يصبح (MD). وكان الرقم الهيدروجيني للاوساط الزرعية بعد التعقيم (٦,٢). وتم تحضين المزارع الفطرية بدرجة حرارة ٣٠° م. وتراوحت مدة التحضين بين خمسة ايام للحصول على الطافرات وثلاثة ايام للحصول على الكونيدات لتحضير العالق الكونيدي.

المحلول الخزين للبينوميل Benomyl:

تم الحصول على النموذج التجاري من المبيد الفطري بنليت والمتوفر لدى الدوائر الزراعية المحلية ويكون حاوياً على مادة فعالة (Benomyl) بتركيز ٥٠% [١٠ ، ١١]. حضر المحلول الخزين بإذابة ٠,٠٢ غرام من المبيد في ٥٠٠ مل من الماء المقطر فتم الحصول على محلول ذي تركيز مقداره ٤٠ مايكروغرام بنليت/مل او ٢٠ مايكروغرام مادة فعاله/مل، وهذا تركيز تقريبي لأن البينوميل قليل الذوبان في الماء. عقم بعد ذلك بالموصدة لمدة ١٥ دقيقة ثم حفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

مصدر الاشعاع:

للحصول على الاشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة (UVC) جرى استعمال مصباح UV مجهز من شركة Philip Harris الانكليزية وهو من نوع NOP 189 Scottish Science اذ يعطي معظم اشعته بطول موجي قدره ٢٥٣,٧ نانوميتر.

تحضير مستخلصات السعد:

جمع وتصنيف السعد:

الاسم العلمي للسعد *Cyperus rotundus*

الاسم الانكليزي Nut Grass

العائلة Cyperaceae [١٢]

جلب نبات السعد من الاسواق المحلية وبعد التأكد من تصنيفه في المعشب النباتي التابع لقسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة الموصل وبالاعتماد على مصدر تصنيف النبات [١٣] تم تنظيفه من الشوائب والاتربة وحفظ في الثلاجة لحين البدء بتحضير المستخلصات.

تحضير المستخلص المائي للسعد:

اتبعت طريقة [١٤] حيث تم وزن ٤٠ غرام من درنات السعد ثم قطعت الى قطع صغيرة ومزجت مع ١٦٠ مل من الماء المقطر المعقم أي بنسبة ١ : ٤ (وزن : حجم)، وبعد ذلك هرس النموذج باستخدام خلاط كهربائي نوع (Ultra–Turrax Blender Germany) وذلك تحت التبريد داخل حمام ثلجي ثم حرك المزيج بوساطة محرك مغناطيسي لمدة ٦٠ دقيقة ثم ترك المزيج في الثلاجة بدرجة ٤°م لمدة ٢٤ ساعة، بعدها تم ترشيح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش ثم استكمل الترشيح باستخدام مضخة التفريغ (Vacum pump) وبذلك حصلنا على المستخلص النباتي الخام. جفف المستخلص الناتج بالتجميد بدرجة – ٥٠°م تحت ضغط مخلخل باستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) وحفظت العينات في ظروف التجميد لحين الاستعمال. وعند الاستعمال تم تحضير محلول خزين منه بتركيز ٢٠٠٠٠٠ مايكروغرام/مل باذابة ١ غرام

من المستخلص المائي الجاف في ٥ مل من الماء المقطر المعقم وعد هذا المحلول المركز القياسي مصدراً لتحضير التخافيف اللاحقة والمستخدمة في البحث.

تحضير المستخلص الكحولي للسعد:

تم الاعتماد على طريقة [١٥] والمحورة عن الطريقة الاساسية للمصدر [١٦]، اذ تم وزن ٤٠ غرام من درنات السعد وقطعت الى قطع صغيرة ومزجت مع ٤٠٠ مل من الكحول الاثيلي بتركيز ٩٥% وتم هرس النموذج داخل حمام ثلجي باستخدام خلاط كهربائي نوع (Ultra – Turrax Blender) الالماني الصنع ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة ٢٤ ساعة ثم رشح خلال عدة طبقات من الشاش واستكمل الترشيح باستخدام قمع بخنر واوراق ترشيح Whatman No. 1 وتم التفريغ باستخدام مضخة التفريغ ثم وضع الراشح في جهاز المبخر الدوار (Rotary vacuum evaporator) وبعد تبخير الايثانول من المزيج لوحظ تكون طبقة كثيفة من المستخلص و الذي جفف بالتجميد لدرجة – ٥٠°م بجهاز التجفيد وحفظ المستخلص الجاف في ظروف التجميد لحين الاستعمال. وعند الاستعمال تم اذابة ١ غرام من المستخلص الكحولي الجاف في ٥ مل من المذيب العضوي Dimethyl sulfoxide (DMSO) لنحصل على تركيز نهائي للخزين قدره ٢٠٠٠٠٠ مايكروغرام/مل.

تعقيم مستخلصات السعد:

عقم المستخلص المائي باستخدام مرشحات غشائية Membrane filter 0.22 µ لمنع مرور الجراثيم من خلالها. اما المستخلص الكحولي فعقم باستخدام طريقة البسترة بدرجة حرارة ٦٢°م ولمدة ١٥ دقيقة [١٧].

تحضير العالق الكونيدي:

تم تحضير عالق كونيدي من السلالة A1 عن طريق جرف مزرعة فطرية بعمر ثلاثة ايام منماة على الوسط MTS وذلك باضافة ١٠ مل من الماء المقطر المعقم الى المزرعة وجرف الكونيدات ونقل هذا العالق الى قنينة معقمة ورج رجاً عنيفاً لتفكيك السلاسل الكونيدية بعدها يرشح هذا العالق باستخدام قمع يحتوي قطناً معقماً، وعد الراشح الناتج هو العالق الكونيدي غير المخفف اي ذي التخفيف 10^{0} واستخدم هذا لتحضير تخافيف عشرية من العالق [9] .

تحديد التركيز المثبط الادنى:

Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

تم تحديد التركيز المثبط الادنى لكل من المستخلص المائي والكحولي للسعد وكذلك للبينوميل باستخدام وسط M والحاوي على تراكيز متصاعدة من المادة المطلوب دراستها اذ كانت تراكيز المستخلص المائي للسعد ١٠٠، ٢٠٠، ٣٠٠، ٤٠٠، ٥٠٠، ٦٠٠، ٧٠٠، ٨٠٠، ٩٠٠، ١٠٠٠ مايكروغرام/مل. بينما كانت تراكيز المستخلص الكحولي ١٠٠، ٢٠٠، ٣٠٠، ٤٠٠، ٥٠٠، ٦٠٠، ٧٠٠، ٨٠٠، ٩٠٠، ١٠٠٠، ٢٠٠٠، ٣٠٠٠، ٤٠٠٠، ٥٠٠٠، مايكروغرام/مل. أما بالنسبة للبينوميل فكانت التراكيز ٠، ٠,٣، ٠,٤، ٠,٥ مايكروغرام/مل. اذ اتبعت طريقة الوخز (Point inoculation) [22] ، وذلك بعمل ٤ وخزات من السلالة A1 في كل طبق M مضافاً اليه تركيز معين للمادة المدروسة، وبعد التحضين لمدة ٤ ايام يلاحظ الاختزال في النمو عن طريق قياس اقطار المستعمرات النامية على كل طبق ثم مقارنتها بقطر المستعمرات النامية على الوسط M الخالي من اي اضافة (التركيز صفر) وتحدد النسبة المئوية للتثبيط لكل مادة كما في المعادلة التالية:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط المعاملة التلقانية (٠) – متوسط المعاملة بالمادة}}{\text{متوسط المعاملة التلقانية (٠)}} \times ١٠٠$$

وبذلك يعين تركيز المسخلص المائي او الكحولي او تركيز البينوميل والذي يتوقف عنده نمو الفطر حول نقطة الوخز اذ يمثل هذا التركيز الادنى لتلك المادة والمثبط لنمو الفطر.

عزل الطافرات وحساب تكرارها:

استخدم المبيد الفطري البينوميل لعزل الطافرات وبتركيز نهائي قدره ٠,٥ مايكروغرام/مل من الوسط الزرعي وذلك بعد ان تبين من الفقرة السابقة ان MIC للبينوميل هو ٠,٥ مايكروغرام/مل، اذ تم تلقيح ٤ اطباق (MD + Benomyl) بعينة مقدراها ٠,١ مل من العالق الكونيدي غير المخفف 10^{0} لكل طبق وبعد التحضين جرى عد المستعمرات النامية والعدد الناتج يمثل عدد الطافرات المقاومة. كما تم اخذ جزء من العالق الكونيدي غير المخفف 10^{0} واجريت له سلسلة من التخافيف العشرية لغاية 10^{-4} وبعدها تلقح ثلاثة اطباق من الوسط MD كل منها بعينة مقدارها ٠,١ مل من ذلك العالق وبعد التحضين تم عد المستعمرات النامية في الاطباق الثلاثة واخذ المعدل بالقسمة على ٣. وتم تقدير حجم العشيرة الكونيدية المتوقعة على الاطباق الحاوية على البينوميل والملقحة من العالق غير المخفف كالاتي:

حجم العشيرة المتوقعة = معدل عدد المستعمرات على اطباق MD × مقلوب التخفيف × عدد الاطباق الملقحة من العالق 10^{0}

ولكي نحصل على تكرار الطافرات المقاومة سواء المستحثة ام التلقائية يتم قسمة العدد الكلي للمستعمرات (الطافرات) النامية على الاطباق الاربعة (MD + Benomyl) على حجم العشيرة المتوقعة من هذه الاطباق الاربعة [22].

دراسة التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لدرنات السعد:

لقد تم الاعتماد على طريقة المعاملة المسبقة (Pretreatment) في دراسة التأثير التطفيري للمستخلص االكحولي لدرنات السعد وكما وصفت من قبل [١٨]. اذ جرى دراسة ثلاثة تراكيز هي ٨٠٠، ٩٠٠ ، ١٠٠٠ مايكروغرام/مل من الوسط الزرعي. حضر عالق كونيدي بتركيز 10^7 كونيدة/مل ونقل الى ٥ قنانٍ زجاجية ثم اضيفت لثلاث منها التراكيز الثلاثة المراد دراستها من المستخلص الكحولي مع ترك القنينة الرابعة بدون معاملة حيث تمثل المعاملة التلقائية (المعاملة صفر) او عينة السيطرة السالبة. تركت تلك القناني لمدة ساعة مع الرج المتكرر بعد ذلك نأخذ جزءاً من العالق الكونيدي لكل من المعاملات الاربع السابقة ونقوم بعزل الطافرات وحساب تكراراتها وكما مذكور سابقا. اما القنينة الخامسة فكانت تمثل عينة السيطرة الموجبة (Positive control) اذ تمت معاملة الكونيدات بمطفر معلوم هو الاشعة فوق البنفسجية UVC وذلك للتأكد من ان السلالة A1 قابلة للطفور عند معاملتها بمطفر معلوم. جرى نقل ١٠ مل من العالق الكونيدي من القنينة الخامسة الى طبق بتري معقم يوضع فوق محرك مغناطيسي تحت مصدر الاشعة وعلى بعد ١٠ سم من قعر الطبق ولمدة ٢٠ دقيقة وفي الغرفة المظلمة. وبعد انتهاء التشعيع ترك العالق ساكناً في الظلام لمدة ساعة ثم اخذ جزء من هذا العالق وجرى عزل للطافرات وحساب تكرارها.

التحليل الاحصائي:

تم عمل ثلاث مكررات للعينة التلقائية والعينات المعاملة بالمستخلص الكحولي للسعد وعينة السيطرة الموجبة، وتم حساب متوسط تكرار الطافرات وايجاد الخطأ القياسي Standard Error (SE) لكل معاملة. وقد تم اجراء التحليل الاحصائي باستخدام اختبار t لاربع درجات حرية $t_{(2+2)}$ عند مستوى احتمالية ١% اذ جرت مقارنة متوسط تكرار الطافرات لكل عينة مع متوسط تكرار الطافرات في العينة التلقائية لملاحظة الفروق المعنوية بين متوسطات عينات المعاملة مقارنة بمتوسط عينة السيطرة [١٩].

النتائج والمناقشة:

التركيز المثبط الادنى للمستخلص المائي والكحولي لدرنات السعد وللبينوميل:

من اجل تحديد التركيز الادنى من المستخلص المائي لدرنات السعد والمثبط لنمو الفطر *A.amstelodami* جرى تتبع التأثير التثبيطي لتراكيز متصاعدة من المستخلص المائي اعتباراً من الصفر وحتى ١٠٠٠ مايكروغرام/مل. ومن النتائج المبينة في جدول (١) نلاحظ ان اقطار مستعمرات الفطر أخذت بالتناقص التدريجي مع زيادة تركيز المستخلص المائي في وسط النمو، اذ تراوحت النسبة المئوية للتثبيط بين ٢,٤١% للتركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل و ٢٦,٤٦% للتركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/مل، يتبين من ذلك ان المستخلص المائي لدرنات السعد له تأثير تثبيطي ضعيف على نمو الفطر حتى عند تركيز ١٠٠٠ مايكروغرام/مل.

جدول (١): قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على تراكيز مختلفة من المستخلص المائي للسعد.

تركيز المستخلص المائي للسعد (مايكروغرام/مل)	المكررات			المتوسط	النسبة المئوية للتثبيط
	R_1	R_2	R_3		
0	2.5	2.88	3.35	2.91	0.0
100	2.88	2.75	2.9	2.84	2.41
200	2.43	2.42	2.58	2.48	4.78
300	2.33	2.33	2.4	2.35	19.24
400	2.28	2.25	2.25	2.26	22.34
500	2.15	2.3	2.25	2.23	23.37
600	2.3	2.2	2.18	2.23	23.37
700	2.15	2.2	2.25	2.2	24.40
800	2.1	2.23	2.25	2.19	24.74
900	2.2	2.18	2.13	2.17	25.43
1000	2.13	2.2	2.08	2.14	26.46

اما بالنسبة للتركيز المثبط الادنى للمستخلص الكحولي فقد جرى اختبار تراكيز متصاعدة ابتداءً من الصفر والى ٥٠٠٠ مايكروغرام/مل. بلغت النسبة المئوية للتثبيط ٣٦,٧٩% بالنسبة للتركيز ١٠٠ مايكروغرام/مل و ٩٥,٩٩% بالنسبة للتركيز ٥٠٠٠ مايكروغرام/مل وكما في الجدول (٢).

جدول (٢): قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للسعد.

تركيز المستخلص الكحولي للسعد (مايكروغرام/مل)	المكررات			المتوسط	النسبة المئوية للتثبيط
	R_1	R_2	R_3		
0	3.05	2.83	3.1	2.99	0.0
100	2.13	1.55	2	1.89	36.79
200	1.6	1.48	1.53	1.54	48.49
300	1.33	1.28	1.55	1.39	53.51
400	1.2	1.33	1.53	1.35	54.85
500	1.5	1.25	1.2	1.32	55.85
600	1.35	1.25	1.2	1.27	57.53
700	1.3	1.1	1.15	1.18	60.54
800	1	1.3	1.1	1.13	62.21
900	0.9	1.2	1.15	1.08	63.88
1000	0.95	1	0.95	0.97	67.56
2000	0.75	0.63	0.7	0.69	76.92
3000	0.3	0.45	0.4	0.38	87.29
4000	0.3	0.25	0.3	0.28	90.64
5000	0.13	0.13	0.1	0.12	95.99

ولقد اشارت بعض الدراسات الى ان الزيوت الاساسية التي تم الحصول عليها من درنات السعد تمتلك تأثيراً مضاداً للفطريات ومنها الكانديدا [٢٠]، اما المصدر [٢١] فقد ذكر ان لتلك الزيوت الاساسية فعالية مضادة للبكتريا وخاصة الموجبة لصبغة كرام اكثر مما في البكتريا السالبة لصبغة كرام. لم يتم الحصول في هذا البحث على تثبيط كامل لنمو الفطر وذلك للمستخلص المائي والكحولي للسعد لكن كانت النسبة المئوية للتثبيط للتراكيز المدروسة للمستخلص الكحولي اعلى بكثير مما في المائي. علماً ان المذيب DMSO المستخدم في تحضير المستخلص الكحولي لم يكن له اي تأثير مثبط لنمو الفطر بالتراكيز المستعملة في البحث وكما ذكره [٢٢]. لذا اقتصر البحث على دراسة التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي فقط، اذ

تم اختيار ثلاث تراكيز منه وهي ٨٠٠ ، ٩٠٠ ، ١٠٠٠ مايكروغرام/مل بوصفها تراكيز تحت سامة (Sublethal). وقد ذكر [٢٣] ان التعبير عن الفعالية التطفيرية يحدث عند تراكيز اقل من المستوى السام (Toxic level) اذ ان المستوى السام يكون مصحوباً بتحطيم DNA.

اما عند تحديد التركيز المثبط الادنى للبينوميل فقد كان من خلال اختبار تراكيز متصاعده منه ابتداءً من الصفر الى ٠,٥ مايكروغرام/مل وكانت النتائج كما مبينة في الجدول (٣) إذ اعطى التركيز ٠,٥ مايكروغرام/مل نسبة تثبيط ١٠٠% ولذلك تم اعتبار هذا التركيز هو التركيز السام للبينوميل واستخدم لعزل الطافرات.

جدول (٣): قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على تراكيز مختلفة من البينوميل.

تركيز البينوميل (مايكروغرام/مل)	المكررات			المتوسط	النسبة المئوية للتثبيط
	R_1	R_2	R_3		
0	2.65	2.8	2.85	2.77	0.0
0.3	0.3	0.35	0.15	0.27	90.25
0.4	0.15	0.25	0.15	0.18	93.50
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00	100

التأثير التطفيري للمستخلص الكحولي لدرنات السعد:

في هذه الطريقة جرت معاملة كونيدات الفطر *A.amstelodami* بالمستخلص الكحولي للسعد وللتراكيز ٨٠٠،٩٠٠ ،١٠٠٠ مايكروغرام /مل لمدة ساعة، وبعد الزرع والتحضين تم حساب عدد الطافرات المقاومة للمبيد الفطري البينوميل التلقائية والمستحثة باشعة UVC، ثم جرى تقدير حجم العشيرة المتوقعة وحساب تكرار الطافرات وكما في الجدول(٤).

الجدول (٤): حجم العشيرة المتوقعة (×١٠^{٦}) وعدد الطافرات المقاومة للبينوميل Benomyl وتكرارها (×١٠$^{-٦}$) المشاهدة بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للسعد بطريقة المعاملة المسبقة مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC بوصفها مطفراً معلوماً.

تركيز المستخلص الكحولي للسعد (مايكروغرام/مل)	R1			R2			R3		
	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
0	5.07	0	0	7.87	3	0.38	7.31	1	0.14
800	4.89	0	0	7.16	4	0.56	5.77	0	0
900	5.31	0	0	6.77	2	0.30	6.87	1	0.15
1000	5.01	0	0	7.40	1	0.14	7.12	0	0
UVC	3.51	19	5.41	3.85	26	6.75	3.35	16	4.53

وبعدها تم ايجاد متوسط تكرار الطافرات المستحثة بالمستخلص الكحولي للسعد والمستحثة باشعة UVC ومتوسط تكرار الطافرات التلقائية. تم اجراء المقارنات الاحصائية باستخدام اختبار *t* عند مستوى احتمالية ١% وذلك بمقارنة متوسطات تكرار الطافرات المقاومة للبينوميل المستحثة بالمستخلص الكحولي للسعد بمتوسط تكرار الطافرات التلقائية فتبين عدم وجود فروق معنوية، اذ كانت قيمة *t* الجدولية ٤,٦٠٤ اكبر من قيمة t_4 المحسوبة لاربع درجات حرية وذلك للتراكيز ٨٠٠ ، ٩٠٠ ، ١٠٠٠ مايكروغرام/مل وكما مبين في الجدول (٥).

جدول (٥): المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (×١٠$^{-٦}$) المقاومة للبينوميل بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي للسعد بطريقة المعاملة المسبقة مع مثيلاتها غير المعاملة.

تراكيز المستخلص الكحولي للسعد (مايكروغرام/مل)	المكررات			(المتوسط ± الخطأ القياسي) (×١٠$^{-٦}$)	قيمة t_4 المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	0	0.38	0.14	± ٠,١٧ ٠,١١	
800	0	0.56	0	± ٠,١٩ ٠,١٩	0.09
900	0	0.30	0.15	± ٠,١٥ ٠,٠٩	0.14
1000	0	0.14	0	± ٠,٠٥ ٠,٠٥	0.99
UVC	5.41	6.75	4.53	± ٥,٥٦ ٠,٦٥	5.53*

٠ : بدون معاملة وتكراراتها تمثل التكرارات التلقائية.

UVC : المعاملة بأشعة UVC القصيرة (السيطرة الموجبة).

* : معنوية عند مستوى احتمالية ١%.

يتضح من تلك النتائج ان التراكيز المدروسة من المستخلص الكحولي لدرنات السعد لم تظهر تأثيراً تطفيرياً في كونيدات الفطر *A.amstelodami* على الرغم من معاملة تلك الكونيدات بالمستخلص لمدة ساعة قبل زرعها على الوسط الغذائي، وهذا ما اكده [٢٤] اذ لم يظهر المستخلص المائي والكحولي لدرنات السعد تأثيراً تطفيرياً عند اختبارهما باستخدام اختبار أمز (Ames test) باستعمال سلالات السالمونيلا *Salmonella* وكذلك اختبار(SOS chromotest) باستعمال *E.coli* بوجود او عدم وجود نظام التنشيط الايضي الخارجي (S_9). وتمثل النتائج التي تم الحصول عليها من البحث الحالي مؤشراً ايجابياً على الاقل كما تظهر ضمن الظروف التجريبية الموصوفة في البحث الحالي وتضاف الى الدراسات التي اشارت الى اهمية هذا النبات بسبب الفعاليات التي يمتلكها، اذ ذكر [٤] ان للمستخلصات المائية والكحولية لدرنات السعد فعالية مضادة للتطفير، كما ذكر [٢١] ان الزيوت الاساسية التي تم الحصول عليها من درنات السعد لها فعالية مضادة للتطفير. اما عند مقارنة متوسط تكرار الطافرات المقاومة للبينوميل المستحثة باشعة UVC (عينة السيطرة الموجبة) بمتوسط تكرار الطافرات التلقائية ظهر ان هناك فرق معنوي اذ كانت قيمة t_4 المحسوبة لاربع درجات حرية ٥,٥٣ اكبر من قيمة *t* الجدولية التي بلغت ٤,٦٠٤ عند مستوى احتمالية ١% وكما مبين في الجدول (٥) . وهذا يدل على ان السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* هي سلالة قابلة للطفور وتستجيب الى المطفرات ومنها المطفر المعلوم UVC [٢٥].

المصادر References :

١. الحاج يحيى، توفيق (٢٠٠٣). النبات والطب البديل. الطبعة الاولى، الدار العربية للعلوم، بيروت، لبنان.

٢. محمد جاد، عبدالمجيد ؛ عمر، محسن آدم ؛ قاسم، امين امين وكريم، يونس سعداوي (١٩٧٩). وصف وتركيب نباتات المحاصيل والحشائش. دار المطبوعات الجديدة، الاسكندرية.

3. Yazdanparast, R. and Ardestani, A. (2007) *In Vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Cyperus rotundus. J. Med. Food., 10,* 667-674.

4. Kilani, S. ; Bouhlel, I. ; Ben, R. ; Abdelwahed, A. ; Hayder, N. ; Mahmoud, A. ; Ghedira, K. and Chekir – Ghedira, L. (2005). Evalutation of the antimutagenic and antiradical potentials of extracts from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus. Toxicological and Environmental Chemistry, 11,* 415 - 425.

5. Sugimura, T. (2000). Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis, 21,* 387 – 395.

6. Krishnaswamy, K. (1996). Indian functional foods: Role in prevention of cancer. *Nutr. Rev., 54,* 127 – 136.

7. Hartl, D. L. and Jones, E. W. (2005). *Genetics*. 6th ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston.

8. Jinks, J. L. and Croft, J. C. (1971). Methods used for genetical studies in mycology. In: C. Booth (ed.) *Methods in microbiology*. Academic press, New York. pp. 479 – 500.

9. Caten, C. E. (1979). Genetical determination of conidia colour in *Aspergillus heterocaryoticus* and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami. Trans. Brit. Myco. Soci., 73,* 65 – 74.

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

11. Van Tuyl, J. M. (1977). Genetics of fungal resistance to systemic fungicides. Ph. D. thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.

١٢.مجيد، سامي هاشم ومحمود، مهند جميل (١٩٨٨). النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي. الطبعة الاولى، مطابع دار الثورة للصحافة والنشر، بغداد، العراق.

13. Townsend, C. C.; Guest, E. ; Omer, S. A. and Al-Khayat, A. H. (1980). *Flora of Iraq.* Vol. 8, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.

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

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

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

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

18. Baburdi, N. and Polit, M. G. (1989). Different action of MMS and EMS in UV sensitive strains of *A.nidulans* . *Mutat. Res*., 217, 211 – 217.

19. Steel, R. G. and Torrie, J. H. (1980). *Principles and Procedures of Statistics.* McGraw – Hill, New York, 590.

20. Duarte, M. C. ; Figueira, G. M. ; Sartoratto, A. ; Rehder, V. L. and Delarmelina, C. (2005). Anti – candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol., 97,* 305 – 311.

21. Chekir – Ghedira, L. ; Chraief, I. ; Hammami, M. ; Kilani, S. ; Abdelwahed, A. ; Ammar, R. ; Hayder, N. and Ghedira, K. (2005). Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) *Cypperus rotundus. The Journal of Essential Oil Research, 17,* pp. 695 – 700.

٢٢. الطائي، رافع قاسم محمد (٢٠٠٦). تأثير مستخلصات الثوم على القابلية التطفيرية لكل من السورالين والاشعة فوق البنفسجية في الفطر *Aspergillus amstelodami*. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

23. McCann, J. and Ames, B. N. (1978). The *Salmonella* microsome mutagenicity test : Predictive value for animal carcinogenicity. In: W. G. Flamm and M. A. Mehlman (eds.). *Mutagenesis.* Hemisphere Publishing Corporation, Washington. pp. 87 – 108.

24. Kilani, S. ; Bouhlel, I. ; Ammar, R. ; Sghair, M. Skandarani, I. ; Boubaker, J. ; Mahmoud, A. ; DiJoux – Franca, M. ; Ghedira, K. and Chekir – Ghedira, L. (2007). Chemical investigation of different extracts and essential oil from the tubers of (Tunisian) *Cyperus rotundus.* Correlation with their antiradical and antimutagenic properties. *Annals of Microbiology*, 57, 657 – 664.

25. Pierce, B. A. (2006). *Genetics.* W. H. Free man and Company, New York, 492-490.

Mutagenicity of tuber extract of *cyperus rotundus* in conidia of *Aspergillus amstelodami*

Mahmood, H. K. ; Abdul-kareem, H. R. ; Al-Hyaly, F. M. ; Dhahi, S. J.
Department of Biology , College of Science , University of Mosul , Mosul, Iraq.
(Received 13 / 4 / 2009 , Accepted 25 / 5 /2010)

Abstract

The present study aimed at testing the mutaginicity of the Tuber extracts of the herb *Cyperus rotundus* in conidia of the fungus *Aspergillus amstelodami*. To this end, a set of experiments we conducted first to test the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the extracts on the growth of the fungus. At a final concentration of 1000 µg extract/ml of the growth medium, the water extract reduced the growth by only 24.46% while alcoholic extract reduced the growth by 67.56% of that without extract. Therefore, only the alcoholic extract was tested for inducing mutation resistant to the fungicide benomyl. Three concentrations of the extract, 800, 900 and 1000 µg/ml were tested but none of them was effective in inducing mutation within the experimental conditions specified.