------مجلة علوم الرافدين، المجلد 26، العدد 1، ص74-85، 2017------

عزل بعض الطافرات المقاومة لبعض المواد الكيمياوية من عينات كونيدية معرضة لأشعة الشمس وعينات غير معرضة من الفطر *Alternaria alternata*

هدى وليد هادي

قسم علوم حياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أستلم 16/ 1 /2014 ؛ قُبل 26 /5 /2014)

الملخص

عزلت 272 عزلة طافرة (161 من كونيدات معرضة لأشعة الشمس و111 من كونيدات غير معرضة لأشعة الشمس) توزعت هذه العزلات بعضها كطافرات مقاومة للمواد الكيميائية الاتية التوباس Topas والازلكوانين 8-Azaguanine والكلورال هايدريت Chloral hydrate من الفطر *Alternaria alternata*. وذلك بعد تحديد فترة التعريض المناسبة لأشعة الشمس و قياس التركيز المثبط الادنى للمواد الكيميائية. وقد كانت فترات التعريض 20 و40 و60 و90 دقيقة والتركيز المثبط الادنى 150 ميكروغرام/مل للتوباس و3.5 ميكروغرام /مل للازلكوانين و 4.5 ملي مولر للكلورال هايدريت. وجرى حساب تكرار الطافرات المقاومة لتلك المواد الكيميائية في الحالتين المعرضة وغير المعرضة. وبالرغم من وجود زيادة في تكرار الطافرات المقاومة من المعرضة لأشعة الشمس عنه في تكرار الطافرات المقاومة من غير المعرضة الا ان التحليل الاحصائي بين عدم وجود فرق معنوي بينهما فأشر ذلك الى ضعف القدرة التطفيرية لأشعة الشمس في تجربة البحث الحالي. كما تم في هذا البحث اختبار المقاومة العرضية بين الطافرات المقاومة لتلك المواد اذ أُشِر وجود مقاومة عرضية بين التوباس وكلٍ من الازلكوانين والكلورال هايدريت وبنسب مئوية مرتفعة اذ بلغت 83 % بين التوباس والكلورال هايدريت و93.2 % بين التوباس والازلكوانين، في حين انعدمت المقاومة العرضية بين الازلكوانين والكلورال هايدريت اذ وصلت في اعلى مستوياتها الى 4%.

الكلمات الدالة: *Alternaria alternata* ، طافرات مقاومة، اشعة الشمس، مقاومة عرضية، مواد كيميائية.

Isolation of Mutants Resistant to some Chemicals from Sunlight –Exposed and Unexposed Samples of the Fungus *Alternaria alternata*

Huda W. Hadi

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

A total of 272 mutants (161 from sunlight exposed and 111 from unexposed conidia) resistant to the chemicals Topas, 8-azaguanine or Chloral hydrate were Isolated in the fungus *Alternaria alternata*. Initially, the exposure periods to sunlight and the minimal inhibitory concentrations for the chemicals were determined. The exposure periods were 20, 40, 60 and 90 minutes and the minimal inhibitory concentrations were 150 µg/ml for Topas, 3.5 µg/ml for 8-azaguanine and 4.5 mM for Chloral hydrate. The frequency of mutants resistant to each chemical was calculated and although the frequencies from the exposed samples were greater than those from unexposed one, the differences, however, were

statistically not significant pointing to the weakness of mutagenicity of the sunlight in the present experimental protocol. Cross resistance exhibited by any of the three classes of resistant mutants to other two chemicals was also tested. A fraction of 93.2% of the Topas resistant mutant cross resisted 8-azaguanine as well, and 83% of them cross resisted Chloral hydrate. Azaguanine resistant mutants and Chloral hydrate resistant mutants, however, exhibited very low cross resistance to those two chemicals, being no more than 4% as its higher proportion.

Keywords: *Alternaria alternata*, resistant mutants, sunlight, cross resistance, chemicals.

المقدمة

يعد الفطر *Alternaria alternata* احد اجناس الفطريات الخيطية ذات الابواغ المقسمة واسعة الانتشار اذ يعد من اكبر المسببات المرضية للمحاصيل الزراعية سواء في الحقل او اثناء النقل او الخزن فهو يصيب عدداً كبيراً من انواع الفواكه والخضر(Ellis,1976) فهو يسبب التنخرات للنسج النباتية مع انتاجه السموم ذات الضراوة العالية (Prasad and Upadhyay, 2010).

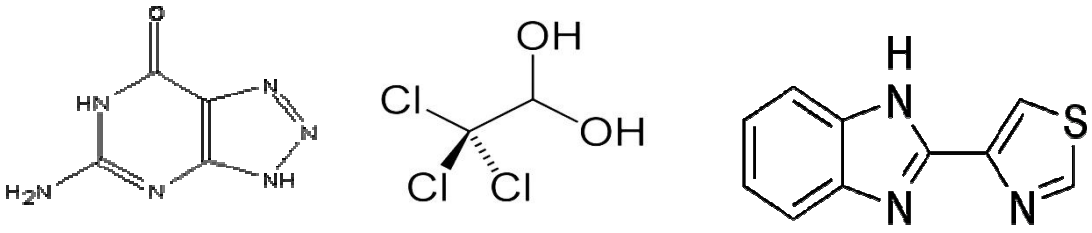
ان استعمال المبيدات الكيميائية في السيطرة على هذا الممرض والفطريات الممرضة النباتية الاخرى طريقة سريعة التأثير واقتصادية لكونها تؤدي دوراً كبيراً في وقاية النباتات او حماية المحاصيل من الاصابة او الحد من انتشار الحشرات الناقلة للأمراض النباتية (العادل، 2006) لكن في الوقت نفسه فان الاستعمال المتكرر لهذه الكيمياويات يمكن ان يحث التغيرات الطبيعية للجينات من خلال نشوء الطفرات المقاومة في تلك المجاميع الفطرية وبالتالي سيصعب السيطرة على هذه الممرضات مستقبلا باستعمال هذه المبيدات نفسها فتصبح هذه الآفات ذات ضراوة عالية (Moore and Frazer , 2002).

الطفرة المقاومة هي طفرة امامية Forward tionmuta اكتسبها الكائن تحت ظروف ليست مناسبة للنمط البري (*al.*,1979 Fincham *et* وعند فشل احد المبيدات في السيطرة على الممرض واستعمال مبيد اخر يمكن ان تنشأ المقاومة العرضية Cross resistance سواء كانت هذه المقاومة العرضية لمبيدات تعود للمجموعة نفسها الكيميائية او مجاميع اخرى من المبيدات الفطرية المختلفة كيميائيا (Leroux *et al.*, 1999). لذا تجرى محاولات كثيرة لتصنيع مبيدات جديدة ضد هذا الفطر و الفطريات الممرضة النباتية الاخرى مثل *Fusarium* و *Septoria* و *Helminthosporium* ليس لها تأثيرات سلبية على المحاصيل الزراعية من ناحية ولا توجد لها مقاومة متصالبة (عرضية) مع مجاميع كيميائية لمبيدات معروفة مثلbenzimidazol وdicarboximide وguanidine (Gehmann *et al.*,1990).

استخدم الباحث Crebelli وآخرون 1991 المبيد توباس Topas المادة الفعالة له2-(4-thiazolyl)-11-1-benzimidazole صيغتها العامة ($C_{10}H_7N_3S$) والاسم العلمي له Thiabendazole وهو مبيد فطري جهازي يتداخل في عملية تجميع خيوط المغزل اثناء عملية الانقسام الخلوي B tubulin assembly يتم استعمال هذا المبيد ضد ممرضات نباتية مختلفة مثل انواع *Aspergillus* و*Fusarium* و*Penicillum* و *Rhizoctonia* بوصفه عقاراً فموياً لمكافحة الديدان المستديرة في الانسان والماشية(Harding, 1980) ويستعمل لتزويد وقاية كاملة 100% ضد مسببات البياض الدقيقي (Pose-Juan *et al.*,2010 Chloral hydrate ($C_2H_3Cl_3O_2$) الاسم العلمي 1,1,2- (Reuveni *et al.*, 1998; اما المادة الاخرى فهي كلورال هايدريت trichloroethylene وهو مركب هيدروكربوني يستعمل في الصناعات الدوائية كمسكن كما يستعمل كمادة فعالة يدخل في تركيب العديد من المبيدات الحشرية والعشبية مثل DDT, trichlorofon, dichlorovos, trichloroacetic الخ (IARC,1995). كما تم اختبار مادة الازلكوانين 8-Azaguanine ($C_4H_4N_6O$) مركب حلقي نظير للقاعدة النيتروجينية الكوانين الداخلة في تركيب

الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) قابل للانحشار في تركيبه واحداث الخلل فيه (Smith and Harrill,1968) اذ يستطيع هذا المركب الولوج الى داخل الخلية عبر نواقل متواجدة في الغشاء البلازمي متخصصة لنقل القواعد النتروجينية سواء كانت بيورين او بيرمدين (Pantazopoulou and Diallinas, 2007)، يوضح الشكل (1) الصيغ البنائية للمواد قيد الاختبار.

Azaguanine Chloral hydrate Topas



الشكل1: الصيغة البنائية للمواد الكيميائية : Topas عن (Merck and Co., 1968)، Chloral hydrate عن (Green and Prout,1985)، 8- Azaguanine عن (King *et al.*, 2006).

لذلك فان الدراسة الحالية تهدف الى عزل طافرات مقاومة مستحثة بأشعة الشمس من الفطر *Alternaria alternata* ومقاومة لمبيدات وعقاقير كيميائية ومن ثم اختبار المقاومة العرضية لها علما ان بعض هذه العقاقير استعملت لأول مرة ضد هذا الممرض النباتي.

المواد وطرائق العمل

1- الكائن الاختباري:

أجريت تجارب البحث على النمط البري من الفطر *Alternaria alternata* الذي تم الحصول عليه من د. ورقاء سعيد قاسم/ جامعة الموصل/ كلية العلوم /علوم الحياة.

2- الأوساط الزرعية وظروف الزرع:

استعمل الوسط الزرعي (Potato Sucrose gar, PSA) (Pitt and Hocking, 2009) لتنمية الفطر وللحصول على كمية كبيرة من الكونيدات كما اعتمد وسط الحد الأدنى(Minimal Medium,M) (Caten, 1979) لقياس التركيز المثبط الادنى للمواد الكيميائية قيد الدراسة وكذلك لعزل الطافرات المقاومة لتلك المواد واختبار المقاومة العرضية بين تلك الطافرات. كما اضيف الملح (Sodium Doxeycholate, D) (Mackintosh and Pritchard,1963) الى تلك الأوساط ليصبح كل منهما(PSAD, MD) على التوالي وذلك بتركيز 400 مايكروغرام/مل للحصول على مستعمرات منفردة ولتسهيل عملية عزل الطافرات المقاومة.

3- تحضير مواد الاختبار:

3-1-مبيد Topas : يحتوي هذا المبيد بشكله المستحاب على مادة فعالة بتركيز75% وهذا يعني ان كل1 مل يحتوي 0.75 غم مادة الفعالة. حضر المحلول الخزين بإذابة 1مل في 100 مل ماء مقطر وكانت التراكيز الدنيا المأخوذة منه جداً قاتلة لذلك تم تخفيف المحلول الخزين مرة اخرى ليصبح التركيز النهائي لمحلوله الخزين 750 ميكروغرام /مل، (الشركة المنتجة) Sharp and Merck Dohm /USA.

3- 2 -8-Azaguanine : تم الحصول عليها من شركة Shanghai pengteng fine chemical co., ltd في الصين بنقاوة تصل ل 98%، تم تحضير محلولها الخزين وذلك بإذابة 0.25 غرام في 1 مل NaOH(1 عياري) ثم أكمل الحجم لـ 100 مل ليصبح محلولها الخزين بتركيز 2500 مايكرو غرام /مل(Hoffman and Malling,1974).

3-3- مادة Chloral hydrate: اذيب الوزن المطلوب من هذه المادة في الماء المقطر المعقم للحصول على محلول خزين بتركيز 100 ملي مولر وقد زودنا بها مشكوراً الاستاذ الدكتور ساهي جواد ضاحي / كلية العلوم / قسم علوم الحياة.

عقمت المحاليل الخزينة باستعمال المؤصدة عند ضغط 1جو وحرارة 121 م°.

4- قياس التركيز المثبط الأدنى:

قيس التركيز المثبط الأدنى (Minimal Inhibitory Concentration, MIC) من خلال زرع الفطر على الوسط M مضافا اليها تراكيز متصاعدة من المواد الكيميائية سابقة الذكر مع ترك طبقين من الوسط M بدون أي اضافة وعدا المعاملة 0. تمت عملية الزرع بطريقة الوخز(Pin Replica) اذ تم عمل 4 وخزات لكل طبق. حضنت الأطباق لمدة خمسة أيام عند 28 م° وبعد الانتهاء من التحضين جرى حساب النسبة المئوية للتثبيط من خلال حساب متوسط اقطار المستعمرات بوجود المادة الكيميائية او عدم وجودها لكل مكرر و كما في المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{\text{متوسط قطر المستعمرة بدون المادة الكيميائية} - \text{قطرها بوجود المادة الكيميائية}}{\text{متوسط قطر المستعمرة بدون المادة الكيميائية}} \times 100$$

اجريت دراسة الMIC بواقع اربع مرات لكل مادة وذلك للتأكد من التراكيز الدقيقة (القاتلة وفوق القاتلة) المطلوبة لعزل الطافرات المقاومة.

5- تحضير العالق الكونيدي:

جرى تحضير العالق الكونيدي من خلال زرع الفطر *A.alternata* على وسط PSA النامي لمدة 5 أيام، اذ اضيف 10 مل من الماء المقطر المعقم وجرفت الكونيدات باستعمال عروة معقمة ثم رشح العالق وذلك بإمراره خلال قمع زجاجي بداخله قطن طبي معقم للتخلص من متبقيات الغزل الفطري والوسط. رج العالق رجا جيدا وذلك لتكسير السلاسل الكونيدية وعد هذا العالق المركز ذو التخفيف 0، ثم حضرت التخافيف المطلوبة لعملية الزرع، وأجريت هذه العملية تحت ظروف معقمة.

6- المعاملة بأشعة الشمس:

اجريت هذه التجربة في وسط شهر تموز واستمرت الى اول شهر اب في منتصف النهار اذ كانت درجة الحرارة 40-45 وذلك من خلال وضع 20 مل من العالق الكونيدي ذي التخفيف 10^0 للفطر *A. alternata* في طبق بتري مكشوف على منضدة معقمة وفي سطح البناية بعيداً عن الحركة وتطاير الغبار اذ كان الطبق تحت اشعة الشمس العمودية مباشرةً كما جرى مزج العالق الكونيدي بين فترة وأخرى باستعمال ماصة معقمة، تمت هذه المعاملة لفترات تعريض مختلفة (0،20،40،60،90) دقيقة إذ تمثل المعاملة 0 السيطرة اي بدون تعريض لأشعة الشمس. كما جرى في ذات الوقت اجراء تجربة السيطرة الحرارية وذلك بترك العوالق الكونيدية لفتراتٍ مختلفة (0,20,40,60,90) دقيقة في المختبر يتم خلالها مزج العوالق الكونيدية بين فترة واخرى.

بعد ذلك أُخِذ 0.1 مل من كل فترة تعريض وفُرِشَ بواسطة قضيب زجاجي على طبق MD، حضنت الأطباق عند 28 م° لخمسة أيام، أُعِيدت التجربة بواقع ثلاث مرات بعدها جرى حساب شدة القتل من خلال عد الافراد الناجية من المعاملة وكما يلي:

شدة القتل = 100 – العدد الحي للأفراد الناجية

$$\text{النسبة المئوية للافراد الناجية} = \frac{\text{عدد الافراد الناجية في المعاملة } x}{\text{عدد الافراد في المعاملة صفر}} \times 100$$

اذ تشير x الى فترة التعريض للأشعة.

7- المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية :

تم تعريض العالق الكونيدي ذي التخفيف 10^0 وذلك كما ورد في (الجاف، 1990) للفطر *Aspergillus amstelodami* من خلال اخذ 15 مل من العالق في طبق بتري مكشوف وضع تحت اشعة مصباح uv نوع Scottish Science NOP 1980 والمجهز من شركة Philip Harris الانكليزية (اذ يطلق اشعة غالبيتها عند طول موجي 253.7 نانوميتر) عن بعد 10 سم عن المصباح مع الرج المستمر من خلال استعمال جهاز Magnetic Stirrer اثناء فترة التشعيع، أجريت المعاملة لفترات زمنية مختلفة فضلاً عن المعاملة 0 كسيطرة، زرع 0.1 مل لكل فترة على طبق MD وتم حساب شدة القتل كما ذكر في المعاملة بأشعة الشمس.

8- عزل الطافرات المقاومة:

جرى عزل الطافرات المقاومة بفرش 0.1 مل من العالق الكونيدي 10^0 باستعمال قضيب زجاجي معقم(L-shape) على 10 اطباق من الوسط (MD +المادة بالتركيز القاتل واحيانا فوق القاتل) و3 اطباق (MD فقط) لغرض حساب العدد الحي من العالق 10^{-3}، بعد انتهاء التحضين لفترة 5 أيام تم التحري عن الطافرات المقاومة التلقائية اما في حالة اخذ العالق الكونيدي المعامل بأشعة الشمس عدت هذه طافرات مقاومة مستحثة (بأشعة الشمس) نامية على الوسط الذي لا تستطيع السلالة البرية من النمو عليه، والتي أعيد اختبارها بذات ظروف العزل للتأكد من مقاومتها مع تلقيح السلالة البرية في الوقت نفسه. تم تكرار هذه التجربة 4 مرات لكل مادة مع حساب حجم العشيرة المتوقع ومن ثم حساب تكرار الطافرات لكل تجربة وكما يلي :

حجم العشيرة الممسوحة المتوقع=معدل عدد المستعمرات في الطبق الواحد من MD × مقلوب التخفيف×10

$$\text{تكرار الطافرات} = \frac{\text{عدد السلالات الطافرة}}{\text{حجم العشيرة المتوقع}} \times 100$$

9- اختبار المقاومة العرضية:

تم اختبار المقاومة العرضية للسلالات المقاومة للعقاقير الثلاثة المستعملة في البحث من خلال تلقيح الطافرات المقاومة لكل عقار على وسط يحوي التركيز القاتل من العقار الاخر فضلاً عن تلقيح السلالة البرية غير القادرة على النمو في هذه التراكيز للمقارنة. بعد انتهاء التحضين جرى تدوين عدد السلالات ذات المقاومة العرضية وعدد تلك التي لا تملك هذه المقامة العرضية ثم حساب النسبة المئوية للطافرات ذات المقاومة العرضية.

النتائج والمناقشة

التركيز المثبط الأدنى

جرى قياس التركيز المثبط الأدنى لمبيد ال Topas اذ وجد انه عند 150 ميكروغرام/مل ان النسبة المئوية للتثبيط تساوي 100، أما أدنى تركيز قاتل لمادة 8-Azaguanine فقد كان 3.5 ميكروغرام/مل وهو تركيز قليل اذا ما قورن بالتركيز القاتل لفطر ذي كونيدات بانوية متعددة مثل *Neurospora crassa* اذ وصل التركيز القاتل للازلاكوانين 200

ميكروغرام/مل(Hoffman and Malling,1974). بالنسبة لمادة Chloral hydrate كان التركيز4.5 ملي مولر هـ و التركيـ ز المثبط الأدنى وكما في (الجداول 1 و 2 و3) على الترتيب.

الجدول 1: النسبة المئوية للتثبيط للسلالة AA1 النامية لمدة خمسة ايام على الوسط M الحاوي على تراكيز متصاعدة من مبيد Tpoas

ميكروغرام/مل Topas	متوسط قطر المستعمرة / سم	النسبة المئوية للتثبيط
0	1.7	
3.75	1.5	11.8
11.25	1.1	29
37.5	0.95	44.1
56.25	0.68	60
75	0.43	74.7
131.25	0.13	92.3
150	0	100

الجدول 2: النسبة المئوية للتثبيط للسلالة AA1 النامية لمدة خمسة ايام على الوسط M الحاوي على تراكيز متصاعدة من مادة 8-Azaguanine.

8-Azaguanine ميكروغرام/مل	متوسط قطر المستعمرة / سم	النسبة المئوية للتثبيط
0	1.7	
1.5	1	41.1
2	0.85	50
2.5	0.4	76.4
3	0.1	94.1
3.5	0	100

الجدول 3: النسبة المئوية للتثبيط للسلالة AA1 النامية لمدة خمسة ايام على الوسط M الحاوي على تراكيز متصاعدة من مبيد Chloral hydrate

mM Chloral hydrate	متوسط قطر المستعمرة / سم	النسبة المئوية للتثبيط
0.5	1.3	23.5
1	1	41.1
1.5	0.7	58.8
3	0.13	92.3
3.5	0.06	96.4
4.5	0	100

المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية(uv) واشعة الشمس

جرى تعريض العالق الكونيدي للسلالة البرية *Alternaria alternata* لأشعة الشمس وبالظروف المذكورة في طرق العمل وبفترات تعريض مختلفة (0،20،40،60،90) دقيقة وبواقع ثلاث مكررات ومن خلال النتائج الموضحة في (الجدول 4) نجد أن اعلى شدة قتل حدثت عند الفترة 90 دقيقة اذ كانت شدة القتل 97.5 هذه النتائج تماثل نتائج ايجاد شدة القتل بأشعة الشمس للفطر *Aspergillus amstelodami* في دراسة الباحثان جرجيس وسعيد، (2005) لكن لم يتم اعتماد هذه الفترة لكونها قاتلة لجميع الكونيدات تقريبا ولأن غاية البحث الحصول على الطافرات المقاومة وليس قتل الخلايا الحية لذلك اعتمدت فترة (60) دقيقة وهي تقريباً تماثل اعلى شدة قتل حدثت باستعمال الاشعة فوق البنفسجية عند فترة 30 دقيقة (الجدول 6) اذ كانت 88.96 فكلما ارتفعت شدة القتل بواسطة مطفر معين قلّ عدد الافراد الناجية من العشيرة المعرضة لذلك العامل المطفر وبالتالي زادت نسبة الافراد الطافرة بين الناجين وهذا ما اشار اليه (Moore and Frazer, 2002) أي أن الطافرات الأكثر حدوثاً او عدداً تحتاج معاملة لفترة اقل باستعمال الاشعة فوق البنفسجية (uv) وهذا شيء طبيعي لان اشعة الشمس تتكون من اطوال موجية مختلفة من ضمنها الاشعة فوق البنفسجية (MD,1965) اذ اثبتت الدراسات ان اشعة الشمس تؤثر على المادة الوراثية منتجةً الطفرات وبالتالي حدوث انواع السرطان في جلد الانسان في الاماكن المعرضة لها (Hocker and Tsao, 2007) دراسة أخرى أكدت النتيجة نفسها في خلايا جلد الفئران (Yoon *et al*., 2009).

تعد الأشعة فوق البنفسجية (uv) مطفراً فيزيائياً موجباً لقدرته على تكوين ثنائيات الثيامين المزدوجة في تركيب الحامض النووي منقوص الاوكسجين(DNA) وتكوين 8-hydroxyguanine (8OH-G) و thymine glycol يتلوها احداث الطفرات الجينية (Ikehata and Ono,2011) ولذلك استعمل هذا المطفر الموجب في هذا البحث للمقارنة فقط مع اشعة الشمس في سبيل حث الطفرات المقاومة للعقاقير الكيميائية وذلك بتعريضها لأشعة الشمس فقط من اجل محاكاة الظروف البيئية عند استعمال تلك العقاقير لمكافحة هذا الممرض النباتي في الحقول الزراعية بوجود اشعة الشمس كعامل بيئي طبيعي ومعرفة مدى امكانية تطور المقاومة لها. ولأجل فصل تأثير الحرارة عن تأثير الاشعة الفوق بنفسجية الموجودة في ذات الاشعة الشمسية اجريت تجربة السيطرة الحرارية لمعرفة مدى تأثير الحرارة على كونيدات هذا الفطر في حالتها المائية اذ تبين نتائج (الجدول 5) ان الفرق في شدة القتل ما بين فترة التعريض لأشعة الشمس عنه بدون التعرض لها كان (63.5) في الفترة (60) والمستعملة في التجارب اللاحقة لأجل الحصول على الطافرات، وهذا الفرق العالي في شدة القتل ربما يعود بدوره الى الاشعة فوق البنفسجية.

الجدول 4: شدة القتل للعوالق الكونيدية للفطر *Alternaria alternata* المعرضة لأشعة الشمس ولفترات زمنية مختلفة.

فترة التعريض (دقيقة)	مكررات عدد المستعمرات			المتوسط (M)	شدة القتل
	R1	R2	R3		
صفر	90	86	105	93.6	
20	38	41	53	44	52.9
40	19	25	22	22	76.49
60	9	15	11	11.6	87.6
90	2	0	5	2.3	97.5

الجدول 5: تعريض العوالق الكونيدية للفطر *Alternaria alternata* لحرارة (45 ^{o}C) لفترات مختلفة للمقارنة مع اشعة الشمس

فترة التعريض(دقيقة)	مكررات عدد المستعمرات			المتوسط (M)	شدة القتل
	R1	R2	R3		
صفر	80	81	78	79.66	
20	71	69	73	71.0	10.9
40	68	70	55	64.33	19.3
60	59	65	58	60.6	23.9
90	24	19	21	21.33	73.3

الجدول 6: شدة القتل للعوالق الكونيدية للفطر *Alternaria alternata* المعرضة للأشعة فوق البنفسجية (uv) ولفترات زمنية مختلفة

فترة المعاملة (دقيقة)	مكررات عدد المستعمرات			المتوسط (M)	شدة القتل
	R1	R2	R3		
صفر	67	93	112	90.6	
10	32	27	35	31.3	65.4
15	23	19	20	20.6	77.2
30	8	13	9	10	88.96

الطافرات المقاومة و تكراراتها

يتبين من الجدول (7) ان تكرارات الطافرات المقاومة للمواد الكيميائية قيد الدراسة والمعاملة بأشعة الشمس هي اعلى من تكراراتها التلقائية والتي لم تعامل بأشعة الشمس وانما تم الحصول عليها بزراعة العالق الكونيدي فقط على التراكيز القاتلة وفوق القاتلة من المواد الكيميائية. إذ يلاحظ أن المبيد Topas كانت تكرار الطافرات المقاومة له المعرضة لأشعة الشمس اعلى من التكرار التلقائي له، في حين ان تكرار الطافرات المقاومة لـ 8-Azaguanine والمعرضة لأشعة الشمس و Chloral hydrate كانت ايضاً اعلى من تكراراتها التلقائية، وهذا أمر طبيعي فالطفرة التلقائية تحدث بترددات واطئة ناتجةً عن تغيرات كيميائية في تركيب الـ DNA والتي بدورها تحدث بسبب اخطاء اثناء التضاعف من ضمنها تكوين الاشكال التوتوميرية tautomer والابدالات الموضعية للقواعد النيتروجينية ومن ثم اضافة او حذف لواحدة او عدد قليل من ازواج القواعد (Moore and Frazer, 2002).

أما تكرارات الطافرات المقاومة لأشعة الشمس فقد كانت مرتفعة مقارنةً بالتلقائية فهذا امر طبيعي بفعل وجود الاشعة فوق البنفسجية (uv) في تركيب اشعة الشمس الواصلة الى سطح الارض والتي تتألف بدورها من ثلاثة اطوال موجية مختلفة وهي uvA(320-400nm) و uvB(290-320nm) و uvC (<290nm) اذ يعد الجزء uvB الجزء المطفر الاقوى من هذه الاشعة لقدرته على تكوين ثنائيات الثيامين. وعمليات الاصلاح الناتجة عنها الاخطاء المحدثة للطفرات (ROS)، كما يقوم المكون الثاني uvA بإحداث انقلابات transversion اذ ترتبط القاعدة الكوانين بالثيامين بدلاً من السايتوسين G → T، كما يشترك uvA

مع uvB في تكوين ما يعرف ببصمة الاشعة فوق البنفسجية (uv signature) بتكوين انتقالات transition فترتبط قاعدة السايتوسين بالثيامين بدلاً من الكوانين C→T (Ikehata and Ono, 2011).

وعند إجراء تحليل إحصائي جرت مقارنة متوسطات تكرار الطافرات المقاومة (للمواد الكيميائية انفة الذكر) التلقائية بمتوسطات تكراراتها المقاومة من المعرضة لأشعة الشمس وقد كانت قيم *t* الجدولية اعلى من قيم *t* المحسوبة عند مستوى احتمالية 0.01 وكذلك عند 0.05، يتبين من ذلك انه لا يوجد فروق معنوية كبيرة بين تلك التكرارات على الرغم من قدرة اشعة الشمس (وخصوصاً الاشعة فوق البنفسجية) على حث الطفرات في تركيب الحامض النووي منقوص الاوكسجين (DNA) وهذا ما يؤكد ان هذه الاشعة ماهي الا خليط من الاطوال الموجية المختلفة ذات التأثيرات المختلفة ايضاً (MD, 1965).

الجدول7: تكرار الطافرات المقاومة ($\times 10^{-3}$) التلقائية (0) والمعرضة لأشعة الشمس (S.L) للمواد Topas و 8-Azaguanine وChloral hydrate

المادة الكيميائية	(S.L)			المتوسط (M)	الخطأ القياسي (SE)	(0)			المتوسط (M)	الخطأ القياسي (SE)	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
	R1	R2	R3			R1	R2	R3			
Topas	26	21	19	22	2.0	18	9	12	13	2.7	0.8 (ns)
8-Azaguanine	23	19	22	21.3	1.2	17	14	17	16	1.0	2.5 (ns)
Chloral hydrate	19	16	21	18.7	1.4	15	15	14	14.7	0.33	1.9 (ns)

S.L : sunlight حث الطافرات بالتعريض لأشعة الشمس.

0 : معاملة تلقائية بالزرع على التراكيز الفاتلة فقط من المواد الكيميائية.

(ns) : عدم معنوية قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة.

المقاومة العرضية

يتبين من الجدول (8) ان المقاومة العرضية بين التوباس والكلورال 57.4 في حالة الطافرات المعرضة في حين كانت 52.4 في الطافرات التلقائية وهذا يشير الى تشابه الهدف الذي تعمل عليه كلا المادتين وهو منع تجميع خيوط المغزل اثناء الانقسام الخيطي وهو ما لوحظ عند تعريض سلالة ثنائية المجموعة الكروموسومية (diploid) من فطر *Aspergillus nidulans* للكلورال والتوباس مما ادى الى زيادة عدد افراد الـ non disjunction ، كذلك تشير نتائج نفس الجدول وجود مقاومة عرضية تجاوزت نصف النسبة المئوية بين التوباس والازلكوانين اذ يدل ذلك على تشابه في التركيب الكيميائي اذ ان كلا المركبين يحتويان على التركيب الحلقي كما مبين في الشكل (1) مما يجعلهما يشتركان في الية النقل عبر الغشاء البلازمي وان اي تبدل يحدث في الية النقل (اي حدوث طفرة) يجعل السلالة الطافرة مقاومة لكلا المادتين وهذا ما اكده (Kanafani and Perfect, 2008).

أما في حالة الطافرات المقاومة لمادة الازلكوانين (الجدول 9) فالمقاومة العرضية تكاد تكون معدومة مع مادة الكلورال في حالتي الطافرات التلقائية والمعرضة في حين وصلت المقاومة العرضية بين الازلكوانين والتوباس لـ 93.2% في حالة المعرضة

و86.6% في حالة التلقائية وهو تقريباً نفس ما اؤشر في المقاومة العرضية لمقاومات التوباس مع الازاكوانين (الجدول8) وأكد نفس الاستنتاج السابق.

عند إجراء تحليل إحصائي لمقارنة النسب المئوية لعدد الطافرات المقاومة لمادة Topas ذات المقاومة العرضية لماديتيChloral hydrate وAzaguanine-8 في حالتيها التلقائية والمعرضة لوحظ ان قيم $t_{(4)}$ الجدولية اعلى من قيم $t_{(4)}$ المحسوبة، لذلك فانه لا يوجد فرق معنوي بين النسب المئوية تلك الطافرات، وكذلك الحال بالنسبة لمقاومات Azaguanine-8 في حالة مقارنة النسب المئوية لطافراتها المقاومة ذات المقاومة العرضية لماديتي Chloral hydrate وTopas كذلك اكدت نفس النتائج بعدم وجود اي فروق معنوية ربما لان الية حدوث الطفرة المقاومة لهذه السلالات الطافرة حدثت بنفس الالية في حالتيها المقاومة والمعرضة لهذه المواد (Fincham *et al.*,1979).

في (الجدول 10) لم تؤشر مقاومات الكلورال وجود اي مقاومة عرضية مع الازاكوانين وهو ما حدث فعلاً في اختبار المقاومة العرضية لمقاومات الازاكوانين مع الكلورال اي الحالة المعاكسة (الجدول 9) تشير هذه النتائج الى الاختلاف الكبير في تركيب الماديتين اذ تحتوي مادة الكلورال على ذرتي كلور (IARC, 1995) بينما يخلو الثاني من الكلور فهو ازول ثلاثي نظير لقاعدة الكوانين (Russell, 2010). أما في حالة اختبار المقاومة العرضية لمقاومات الكلورال مع التوباس فقد وصلت الى 53.1% في حالتها التلقائية مشابهةً بذلك نتيجة الصورة العكسية لمقاومات التوباس في اختبار مقاومتها العرضية مع الكلورال (الجدول 8) لكن لوحظ في الحالة المعرضة لأشعة الشمس ان النسبة المئوية للطافرات المقاومة كانت اعلى بكثير اذ وصلت الى 83 % وهي نسبة عالية اذا ما قورنت بالحالة المعكوسة لمقاومات التوباس مع الكلورال (الجدول 8) وفي حالتها المعرضة ايضاً، ولذلك عند اجراء تحليل احصائي لمقارنة النسب المئوية للطافرات المقاومة لمادة الكلورال و المعرضة للشمس مع التلقائية المقاومة للكلورال واللتان يمتلكان مقاومة عرضية مع التوباس (الجدول 10) وجد انه هناك فرق معنوي كبير وذلك لان النسب المئوية للمقاومة العرضية للتوباس كانت اعلى في الطافرات المقاومة للكلورال المعرضة للشمس من تلك الطافرات المقاومة التلقائية للكلورال الغير معرضة وليس لدينا تفسير لذلك حالياً.

الجدول 8: المقاومة العرضية للطافرات المقاومة ل Topas مع Chloral hydrate و 8-Azaguanine

مصدر الطافرات المقاومة	% م.ع مع Chloral hydrate			M ±SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة	% م.ع مع 8-Azaguanine			M ± SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
	R1	R2	R3			R1	R2	R3		
S. L	54	58.2	60	57.4±1.8	1.4 (ns)	100	73	85	86 ±7.8	0.1 (ns)
0	51.2	52.9	53	52.4 ±0.6		64	75	90	76.3±7.5	

الجدول 9: المقاومة العرضية للطافرات المقاومة ل 8-Azaguanine مع Chloral hydrate و Topas

مصدر الطافرات المقاومة	% م.ع مع Chloral hydrate			M ± SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة	% م.ع مع Topas			M ± SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
	R1	R2	R3			R1	R2	R3		
S. L	4	2	1	2.3±0.9	*2.9	90	93	96.5	93.2±1.9	(ns)1.5
0	0	0	0	0±0.0		85	88.2	86.5	86.6 ±0.9	

الجدول 10: المقاومة العرضية للطافرات المقاومة ل Chloral hydrate مع 8-Azaguanine وTopas

مصدر الطافرات المقاومة	% م.ع مع 8-Azaguanine			M ± SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة	% م.ع مع Topas			M ± SE	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
	R1	R2	R3			R1	R2	R3		
S. L	2	0	0		1.5 (ns)	81.9	83.1	84.0	83±0.6	*9.0
0	0	0	0			50	55.8	53.5	53.1±1.7	

S.L : sunlight حث الطافرات بالتعريض لأشعة الشمس .

0 : معاملة تلقائية بالزرع على التراكيز القاتلة فقط من المواد الكيميائية .

% م.ع : النسبة المئوية للطافرات ذات المقاومة العرضية .

* : فروق معنوية عند مستوى احتمالية 0.05 .

(ns) : عدم وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية 0.05 .

المصادر العربية

الجاف، بهروز محمود أمين (1990). دراسة وراثية لبعض مقاومات المايتوز في الفطر *Aspergillus amstelodami*، رسالة ماجستير، كلية العلوم، العراق.

العادل، خالد محمد (2006). مبيدات الآفات. مفاهيم اساسية ودورها في المجالين الزراعي والصحي. كلية الزراعة. جامعة بغداد.

جرجيس، رافعة قادر؛ سعيد، جيهان موفق (2005). التأثير التطفيري لأشعة الشمس في الفطر اسبرجلس امـستيلودامي. مجلـة علوم الرافدين، **16**(7)،134-144.

المصادر الأجنبية

Caten, C.E. (1979). Genetical determination of conidial color *Aspergillus heterocaryoticus* and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami. Trans. Br. Mycol. Soc.*,**73**, 65-74.

Crebelli, R.; Conti, L.; Conti, G.; Carere, A. (1991). *In vitro* studies with nine known or suspected spindle poisons :result in test for chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. *J. Mutag.*,**6**,131-136.

Ellis, M.B. (1976). " More Dematiaceous Hyphomycetes". Common Wealth Agriculture Bureau, Kew, England.

Fincham, J.R.S.; Day, P.R.; Radford, A. (1979). "Fungal Genetics". Blackwell, Oxford.

Gehmann, K.; Nyfeler, R.; Leadbeater, A.J.; Nevill, D.J.; Sozzi, D. (1990). A new phenylpyrrole fungicide for broad-spectrum disease control .Bright on Crop Protection Conference, *Pests and Diseases*, **2**, 399-406.

Green, T.; Prout, M.S. (1985). Species differences in response to trichloroethylene. II. Biotransform-

ation in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* **79**, 401-11.

Harding, W.C. (1980). Pesticide Profiles, part two fungicides and nematicides. Univ.Maryland, Coop.Ext. Service Bull.

Hocker, T.; Tsao, H. (2007). Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum. Mutat* **28**, 578–588.

Hoffman, G.R.; Malling, H.V. (1974). Mutants of *Neurospora crassa* resistant to 8-azaguanine. *J. Gener. Microbiol.* **83**, 319-326.

Ikehata, H.; Ono, T. (2011). The mechanisms of uv mutagenesis. *J. Radiat. Res.,* **52**,115- 125.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1995). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chloral and Chloral Hydrate, pp. 245-269, Vol. 63, IARC, Lyon, France.

Kanafani, Z.A.; Perfect, J.R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* **46**, 120-128.

King, R.C.; Stansfield, W.D.; Mulligan, P.K. (2006). "A Dictionary of Genetics". Oxford University Press, Inc.

Leroux, P.; Chapeland, F.; Desbrosses, D.; Gredt, M. (1999). Patterns of cross resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana (Botrytis cinrea*) isolates from French vineyards. *Crop Protec.,***18**, 687-697.

Mackintosh, M.E.; Pritchard, R.H. (1963). The production and replica plating micro-colonies of *Aspergillus nidulans. Genet. Res.,* **4**, 320-322.

MD, S.M. (1965). Composition of sunlight and of a number of ultraviolet lamps *Arch. Dermatol.* **91**, 495-496.

Merck and Co., Inc. (1968). The Name, Chemical Identity, and Composition of the Pesticide Chemical: [Thiabendazole]. (Compilation; unpublished study received Aug 28, 1970 under 1F1031; CDL:093340-B).

Moore, D.; Frazer, L.N. (2002). "Essential Fungal Genetics". Springer- Verlag, New York.

Pantazopoulou, A.; Diallinas, G. (2007). Fungal nucleobase transporter. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**,657-675.

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). "Fungi and Food Spoilage". Springer, New York. pp. 21-57.

Pose-Juan, E.; Rial-Otero, R.; Lopez-Periago, J.E. (2010). Sorption of penconazole applied as a commercial water-oil emulsion in soils devoted to vineyards. *J. Haz.Mat.,* **182**,136-143.

Prasad, V.; Upadhyay, R.S. (2010). *Alternaria alternate* f. sp. *Lycopersici* and its toxin trigger production of H_2O_2 and ethylene in Tomato. *J. Plant. Pathol*., **92**, 103-108.

Reuveni,R.; Dor, G.; Reuveni, M. (1998). Local and systemic control of powdery mildew (*Leveillula taurica*) on pepper plants by foliar spray of mono-potassium phosphate. *Crop Protec.,***17**,703-709.

Russell, P.J. (2010). "Genetics". Benjamin, San Francisco.

Smith, R.L.; Harrill, J.C. (1968).Incorporation of 8-azaguanine and guanine by *Cladosporium resinae*.*Appl.Microbiol.* **10**,1454-1456.

Yoon, J., Prakash, L.; Prakash, S. (2009) Highly error-free role of DNA polymerase η in the replicative bypass of uv-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *USA* **106**, 18219–18224.