مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية المجلد 19 (4) 2006

نظام حياتي جديد للكشف عن المسرطنات و المطفرات البيئية أومضاداتها

بشرى محمد امين محمد و نجاح شمو كاتي
قسم علوم الحياة،كلية التربية، ابن –الهيثم ،جامعة بغداد

الخلاصة

تم استحداث نظام اختباري للكشف عن المطفرات و المسرطنات البيئية ومضاداتها، و ابتدأ ذلك بعزل طافرات مقاومة للمضاهئ 8- آزوجوانين (8- azguanine) تلقائية و مستحثة بالضوء فوق البنفسجي من كلتا السلالتين البريتين H1/5.5 و Bc9/6.6 للفطر البازيدي *Coprinus cinereus* وبعد اختبار هذه الطافرات علىتراكيز مختلفة من المضاهئ8- آزوجوانين و قدرتها على استعمال القواعد البيورينية ونواتج تكسرها كمصادر نتروجينية وحيدة في وسط النمو ومن ثم قدرتها على النمو على الوسط Hypoxanthine,Aminopterin,Thymidine. (HAT) و استناداً الى صفاتها المظهرية للنمو في الحالات اعلاه فقد صنفت على اربع مجاميع مظهرية لكل سلالة منها . كانت جميع الطافرات المقاومة متنحية في صفة مقاومتها على اليلاتها البرية و حددت اختبارات التتام اربعة جينات تشخص لأول مرة تتحكم في صفة المقاومة للمضاهئ 8- آزوجوانين في الفطر *Coprinus* وهي azg^r-1، azg^r-2 ، azg^r-3 ، azg^r-4 ثلاثة منها azg^r-1، azg^r-2، azg^r-4 مشتركة في طافرات السلالتين البريتين H_1 و Bc9 بينما وجد أن الجين azg^r-3 في طافرات السلالة البرية Bc9 ، اما الجين azg^r-1 فقد تميزت طافراته بعدم قدرتها على استعمال الهيبوزانثين Hypoxanthine و الجوانين Guanine كمصادر وحيدة للنتروجين في وسط النمو و لم تستطيع طافراته النمو على الوسط HAT وكانت مقاومة لجميع تراكيز المضاهئ المستخدم و لغاية 250 مايكروغرام /مل وقد عد هذا الجين ممثلاً لطفرة ادت الى فقد او تحور في خصوصية الانزيم HGPRT (Hypoxanthine- Guanine Phosphoribosyl Transferase).وقد حدد

موقع هذا الجين من خلال التحليلات الوراثية للسبورات ، حيث ابدى هذا الجين ارتباطاً مع الجين *B* الواقع على المجموعة الارتباطية الثانية ويبعد عنه بمسافة 28 وحدة خريطة. وبالاعتماد على طفرة الجين HGPRT في السبورات اللاجنسية (الاويديا) للسلالة AZG78 تم اختبار قدرة المستخلص المائي للثوم في الحد من الفعل المحث لهذه الطفرة بأستعمال المطفر مايتوماسين -C اختباري الحيوية و معدل طفرة الجين HGPRT ولغرض الوصول الى هذا الهدف ، استخدمت تراكيز متدرجة لمستخلص الثوم ومن ثم تم انتخاب التركيز الامثل بحيث اعطى حيوية عالية و مستوى تطفير واطئ وكما هو الحال في السيطرة السالبة .

تبع ذلك الاجراء التداخل بين التركيز الامثل و المطفر مايتوماسين -C و بتركيز مطفر و بثلاث معاملات (قبل وبعد او مع المطفر)، وذلك لاختبار فعالية هذا المستخلص في منع او تحوير او تقليل فعل المطفر مايتوماسين -C ،ووجد أن ليس لمستخلص الثوم اي تأثير سام او مطفر في السبورات اللاجنسية للفطر *Coprinus* كما وجد أن للمستخلص افضل كفاءة تثبيطية تجاه التأثيرات التطفيرية للمطفر مايتوماسين -C لدى معاملة السبورات اللاجنسية للفطر بمستخلص الثوم قبل معاملتها بالمطفر وبالاعتماد على طفرة الجينHGPRT كدليل وراثي. وبذلك يمكن أن يعد مستخلص الثوم المائي مثبطاًمن النوع المباشر Desmutagen للفعل الوراثي السام للمطفر مايتوماسين -C ، وهذه النتائج تدعم الفرضية القائلة بأمكانية استخدام الثوم ومركباته لاستخراج عقار قد يكون ذو شأن وقائي في علاج مرض السرطان هذا فضلاً عن امكانية استخدام طفرة الجين HGPRT كنظام بايولوجي حساس في الكشف عن المسرطنات البيئية او مضادات تلك المسرطنات.

المقدمة

بات من المعروف بأن هناك اكثر من دليل على ان الطفرات الجينية أو الكروموسومية هي من العوامل المهمة في حدوث السرطان (1) ويبدو طبيعياً بأن معدل حدوث السرطان يمكن ان يقل بأختزال معدل حدوث الطفرات ، والطريق المؤدي الى ذلك هو تحديد اي من العوامل البيئية التي يمكن ان تكون مسرطنة لا سيما وان قرابة

90% من الاصابات السرطانية تعود الى ظروف بيئية (2) .يتبع ذلك عملية التخلص من تلك العوامل او تجنب تعرض الانسان لها ، وعلى هذا الاساس فقد ظهرت العديد من الاختبارات الوراثية قصيرة الامد Short- term genetic tests ذات الفائدة في تحديد المطفرات والمسرطنات البيئية مثل اختبار طفرة Ames الراجعة لبكتريا *Salmonella typhimurium* (3).

وتم الاعتماد و لأول مرة على طفرة الجين *azg*^{r}-1 في السلالة AZG78 المسؤول عن انتاج انزيم HGPRT و التي عزلت تلقائيا عن السلالة H1 /5.5 للفطر *Coprinus cinereus* والتي اظهرت مقاومة للمضاهي السام ورائيا 8- آزواجوانين كنظام اختباري اظهر كفاءة وحساسية في الكشف عن بعض المطفرات و المسرطنات البيئية . لكن من الوجهة العملية يبدو صعبا بعض الشيء تحديد كافة المركبات الكيمياوية الطبيعية و المصنعة في محيطنا و التي يمكن ان تكون مطفرة او مسرطنة لذا فقد تم استخدام النباتات المتمثلة بالخضروات و الفواكه والنباتات الطبية كوسائل من شأنها ان تمنع او تقلل من حدوث تلك الطفرات المستحثة لما تحويه من عوامل كيمياوية طبيعية و قائية Chemopreventive agents ضد بعض الامراض ذات العلاقة بنمط معيشة الانسان كأمراض الاوعية القلبية والسرطان .لقد تم استخدام في هذه الدراسة المستخلص المائي للثوم *Allium Sativum* L. للكشف عن قدرته المضادة للتفطر ومن ثم المضادة للتسرطن وبالاعتماد على طفرة الجين HGPRT عبر نظام الفطر *Coprinus* ، وفي الحقيقة ان الاهتمام بالمستخلصات النباتية و تعيين مركباتها ذات الخصائص الكيميائية الوقائية و تصميم التجارب لتحديد السموم الوراثية البيئية و مضاداتها واليات عمل تلك الكيمياويات سيقود مع الوقت الى مسار منطقي و مؤثر للحصول على مركبات كيمياوية وقائية ضد مرض السرطان .

المواد وطرق العمل

اجريت التجارب الاتية لغرض عزل طافرات تلقائية و مستحثة مقاومة للمضاهيءالقاعدي 8- آزوجوانين من كلتا السلالتين البريتن Bc9/6.6 و H1/5.5

للفطر البازيدي *Coprinus cinereus* وتحديد موقع الجين HGPRT على الخارطة الوراثية للفطر و اختبار قدرة المستخلص المائي للثوم في الحد من اثر المطفر الوراثي السام مايتوماسين C- (الاسم السابق للفطر *Coprinus lagopus*) وذلك باختبار قدرة مايتوماسين C- على استحثاث طفرات في الجين HGPRT في السبورات اللاجنسية للفطر و بالاعتماد على اختباري معدل الحيوية و معدل طفرة الجين HGPRT . و استخدمت لهذا الغرض عدد من السلالات البرية و الاختبارية (تم تزويدنا بها مشكوراً الدكتور Moor من جامعة مانشستر) وهي احادية النوى و تم التعامل مع سبوراتها اللاجنسية (الأويديا) غير المعاملة كما في الشكل (1) ، و اديمت السلالات و كذلك الطافرات المعزولة كغزل فطري داخل قناني معقمة سعة (25مل) تحوي على الوسط الغذائي الكامل و حضنت في 25 م° في حين اجريت جميع التجارب في المختبر في ظروف الحاضنة على درجة حرارة (37 م°).

عزل الطافرات المقاومة للمضاهىء8- آزوجوانين

لقد تم عزل 150 طافرة مقاومة للمضاهىء 8- آزوجوانين ، كانت 72 منها تلقائية و ما تبقى استحث بالضوء فوق البنفسجي من كلتا السلالتين البريتين Bc9/6.6 و 5.5H1/ للفطر البازيدي *Coprinus cinereus* بحيث اتبعت طريقة (5،4) في تهيئة العالق السبوري و عملية زرع الاويديا و كيفية اعداد الاوساط الغذائية و طريقة اجراء التحليلات الوراثية الخاصة بالفطر.

_عزل الطافرات التلقائية

حضر عالق سبوري اصلي حاوي على 10^7 من الاويديا / مل من كل سلالة واستخدام 1 مل من عالق كل سلالة لتلقيح 10 اطباق من الوسط NCM الحاوي على المضاهي السام 8- آزوجوانين بتركيز نهائي في وسط النمو مقداره 50 مايكروغرام/مل من وسط النمو (حيث وجد بالتجربة أن التركيز 10 مايكروغرام/مل من وسط النمو كان كافياً لقتل السلالتين البريتين Bc9/6.6 و 5.5/ H1) و بعد 4-3 ايام من الحضن في 37م ° لوحظ نمو بعض المستعمرات من كلا السلالتين و قد عدت هذه السلالات ممثلة للطافرات المقاومة. جرت تنقية هذه السلالات بطريقة عزل السبور الواحد على نفس الوسط الذي عزلت عليه اولاً اي الوسط NCM الحاوي على المادة السامة.

_عزل الطافرات المستحثة بالضوء فوق البنفسجي

جرى تحضير عالق سبوري بكثافة 10^7 من الاويديا /مل . عرض 5مل من هذا العالق على الضوء فوق البنفسجي و بطول موجي مقداره 254 نانوميتر من خلال مصباح UV- Bestrahlungs lamp في الظلام و لمدة 10 دقائق (حيث وجد من خلال التجربة بأن مثل هذا التعرض كاف لقتل 95% من الاويديا). تركت الاويديا المعاملة في الظلام لمدة ساعة واحدة. استعمل هذا العالق لتلقيح 10 اطباق من الوسط NCM مضافاً له المادة السامة 8- آزوجوانين و بتركيز 50 مايكروغرام/ مل و بواقع 0.1 مل لكل طبق ، حضنت الاطباق و عزلت السلالات المقاومة التي اعطت نمواً على الاوساط بعد 4-5 ايام و نقيت كما جاء في حالة الطافرات التلقائية.

اختبار مستوى مقاومة المضاهىء8- آزوجوانين

جرى اختبار قدرة الطافرات التلقائية و المستحثة المقاومة للمطفر 8- آزوجوانين و المعزولة من كلا السلالتين البرتين Bc9 و H1 على النمو على تراكيز مختلفة من 8- آزوجوانين ابتداًء من التركيز 50 مايكروغرام/مل و لغاية 250 مايكروغرام من وسط النمو NCM و ذلك بأخذ المستويات 50،100 150، 200، 250 مايكروغرام/ مل.

اختبار قدرة الطافرات على استعمال البيورينات ونواتج تكسرها كمصادر و حيدة للنتروجين في وسط النمو

لقد جرى اختبار قدرة الطافرات و السلالتين البريتين على النمو على الوسط SNC الخالي من كلوريد الامونيوم NH_4Cl والمجهز خارجياً بأحدى القواعد النتروجينية او نواتج تكسرهاكمصدر وحيد للنتروجين في وسط النمو . وذلك من اجل البحث عن وجود علاقة بين مظهر المقاومة للمضاهىء8- آزوجوانين و بين الخلل او الطفرة في المسار الهدمي للقواعد البيورينية و قد شملت مصادر النتروجين كلا من الادنين (Adenine) والجوانين (Guanine) والهيبوزانثين (Hypoxanthine) والزانثين (Xanthine) وحامض اليوريك (Uric acid) والالنتوين (Allantion) (و قد جرى استعمال هذه المصادر كلا على حدة و بتركيز نهائي في و سط النمو مقداره 100 مايكروغرام/مل (6).

اختبار قدرة الطافرات على النمو على الوسط HAT

الوسط HAT هو عبارة عن الوسط NCM مضافا اليه الهيبوزانثين Hypoxanthine و الامينوبترين Aminopterin و الثايمدين Thymidine وبتراكيز نهائية تم التوصل اليها عن طريق التجربة بلغت 5 $10x^{-4}$ مول ، 4.5×10^{-5} مول و 5×10^{-5} مول على الترتيب و جرى استعمال كل التباديل (Combinations) الممكنة من المكونات الوسط HAT . من المعروف بأن صفة المقاومة للمضاهيء 8- آزوجوانين في اغلب الحالات تعتمد على حدوث طفرة في الجين المشفر HGPRT لذا فعند حدوث طفرة في هذا الانزيم فلن يتحول المضاهيء الى شكله السام و في الوقت نفسه تصبح الطافرات غير قادرة على الاستفادة من القواعد النتروجينية المجهزة خارجياً في وسط النمو لبناء النكليوتيدات بطريق الانقاذ Salvage pathway وسوف تعتمد بصورة كاملة على الطريق الجديد *denovo* pathway للحصول على النكليوتيدات . فأذا ما اغلق الطريق الجديد بأضافة الـAminopterin فأن السلالات غير الطافرة تستطيع النمو بالاستفادة من القواعد المجهزة في الوسط بأتباع طريق الانقاذ اما الطافرات فلن تستطيع النمو . وللتميز بين الطافرات الجين HGPRT والطافرات المقاومة للمضاهيء 8- آزوجوانين من الانواع الاخرى استعمل الوسط HAT.

اختبار السيادة

لغرض تحديد سيادة الطفرة او تنحيها بالنسبة للسلالة البرية اعتمدت تجارب السيادة بأستخدام ثنائيات النوى (Dikaryones) و حسب طريقة(7) على المضاهي 8-آزوجوانين وبتركيز 50 مايكروغرام /مل من وسط النمو NCM بحيث نقلت القطع الحاملة للغزل الفطري ثنائي النوى الى الوسيطين NCM و NCM مضافا اليه 8 - آزوجوانين وقورن النمو لكل ثنائي النوى على هذين الوسيطين .

اختبارات التتام

اجريت اختبارات التتام Complementation على اساس صفة المقاومة للمضاهي 8 - آزوجوانين بشكل ثنائيات النوى ، ولما كانت جميع طافرات السلالتين Bc9, H1 متنحية بالنسبة لصفة المقاومة للمضاهي 8- آزوجوانين ،لذلك كان

بالامكان استخدامها في اختبارات التتام ، وقد تم تحضير ثمانية طافرات اختبارية بواقع طافرة واحدة من كل مجموعة مظهرية لطافرات H1 و Bc9 والتي جـرى تقسيمها حسب خصائصها المظهرية انفا وقد امتلكت سبعـة منها اليات الـتزاوج A40, B40 وواحدة فقط كانت اليلات تزاوجها A6,B6 وقد تم الحصـول على الطافرات الاختبارية بالخطوات الاتية :-

- تم عشوائيا انتقاء طافرة واحدة من كل مجموعة من المجاميـع المظهرية الاربعة لطافرات H1 , Bc9 وهي الطافرات المرقمة 15, 63, 75و70 وذلك بالنسبة لطافرات Bc9 والطافـرات المـرقمة 78, 87, 96و114 بالنسبة لطافرات H1 .
- تم الحصول على ثنائيات النوى بين كل طافرة من الطافرات المرقمة اعلاه واحدى السلالتين ZBR18, ZR388 ويوضح الجدول (1) التركيب الجيني لهذا الطافرات .
- تم الحصول على ثمانية اجسام ثمرية من زراعة ثنائيات النوى اعلاه على روث الخيل وحسب طريقة (6) .
- عزل عدد من السبورات الجنسية (30-40) بأخذ قطع صغيرة من نسيج الغلاصم من مناطق مختلفة من القبعة في الجسم الثمري وبحسب طريقة (8) وحضر عالق سبوري منها يحوي على 10^7 سبور لكل مل واستخدم ١ مل من العالق لتلقيح 10 اطباق من الوسط الغذائي الكامل (CM) وتم فرش السبورات بوساطة الناشر الزجاجي وحضنت في 37م° وبعد 24 ساعة تم عزل السبورات بطريقة عزل السبور الواحد على الوسط NCM ايضا.
- بعد نمو الغزل الفطري لهذه السبورات المعزولة اختبرت من حيث مستوى مقاومتها للمضاهيء 8- آزوجوانين واستغلالها للهايبوزانثين والجوانين كمصادر وحيدة للنمو فضلا عن قدراتها على النمو على الوسط HAT واخيراً نموها على الوسط NCM مضافا اليه الفركتوز بتركيز 5 ملي مول لكل لتر من NCM والميثايونين بتركيز 100 ملي غرام لكل لتر من NCM .
- عينت اليلات تزاوج السبورات المعزولة بتكوين ثنائيات النوى بين الطافرات الاختبارية والسلالات البرية

سميت السلالات المنتقاة بالطافرات الاختبارية واعطيت نفس رموز السلالات التي اشتقت عنها وميزت باضافة الحرف الصغير (a) خلف كل طافر اختبارية . وبتوفير الطافرات الاختبارية لكل من طافرات Bc9, H1 صار بالامكان اجراء اختبارات التتام بينها وبين بعض طافرات كل مجموعة مظهرية من المجاميع الاربع العائدة لطافرات Bc9 , H1 وجرت اختبارات التتام بعمل ثنائيات النوى بينهما وقورن نمو ثنائيات النوى على الوسطينNCMو NCM مضافا اليه المضاهيء 8- آزوجوانين بتركيز 50 مايكروغرام /مل.

تعيين موقع الجين Azg^r-1 او الجين HGPRT

وفقا للخصائص المظهرية التي اظهرتها طافرات السلالة البرية Bc9 (*AZG* 72 18,37,63) وطافرات السلالة البرية H1 (77, 78, *AZG* ,115,108,85,81) ولاسيما عدم قدرتها على النمو على الوسط HAT فلا بد ان تعزى مقاومتها الى الطفرة في الجين المسؤول عن انتاج الانزيم HGPRT وقد تم تعيين موقع طفرة HGPRT على الخريطة الوراثية للفطر للمرة الاولىمن خلال تحليل نسبة الاتحادات الجديدة لـ 100 سبور جنسي عزلت عشوائياً من جسم ثمري تم الحصول عليه من خلال تكوين ثنائيات النوى بين السلالة ZR388 وبين الطافرة AZG78 و هذه الطافرة عزلت بطريقة تلقائية حيث حدد ارتباط الجينات بأستعمال مربع كاي و حينما حددت المسافة بين جينين مرتبطين استعمل القانون :

$$\text{المسافة} = \frac{\text{عدد التشكيلات الجديدة}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$$

تأثير المستخلص المائي للثوم في اويديا الفطر

تم شراء عينات من ابصال الثوم من الاسواق المحلية في بغداد خلال شهر نيسان و تم استخلاصها مائياًحسب طريقة (9) وهيئت انابيب اختبار معقمة حاوية على 2مل من العالق الاويدي الاصلي (حاوي على 10^7 من الاويديا لكل مل) معزولة عن طريق الطرد المركزي و خصصت ثلاثة انابيب مكررة للسيطرة السالبة و ثلاثة انابيب لكل تركيز من تراكيز المستخلص التدريجية و التي بلغت

(10%,6.5,4,3,2,1.5,1.0,0.5,0.25). اضيف 2مل من محلول المستخلص المائي للثوم الى كل انبوبة من الانابيب المخصصة بأستثناء انابيب السيطرة حيث اضيف 2مل من دارىء الفوسفات الفسيولوجي (PBS) المعقم بدلا من محلول المستخلص ثم حضنت الانابيب لمدة ثلاث ساعات بدرجة 37 م^{o} و عرضت بعدها للطرد المركزي بسرعة 3500 دورة /دقيقة و لمدة 15 دقيقة و تم التخلص من الطافي. غسلت الاويديا بأستخدام 2مل من الPBS المعقم للحصول على اويديا جاهزة للزرع ، حيث تمثل انابيب السيطرة السالبة الاويديا غير المعاملة بينما خصصت الانابيب المتبقية للاويديا المعاملة بالمستخلص الغرض من هذه التجربة هو دراسة اثر التراكيز المختلفة للثوم على حيوية و معدل طفرة الجين HGPRT في السبورات اللاجنسية (الاويديا) للسلالة AZG78 المشتقة عن السلالة H1 /5.5.

تأثير التداخل بين المستخلص المائي للثوم و المطفر مايتوماسين -C (Mitomycin-C) على حيوية الاويديا و معدل طفرة الجين HGPRT

استخدم في هذه التجارب التركيز 1% من مستخلص الثوم و الذي تم انتخابه التداخل بينه وبين المطفر مايتوماسين -C واجريت التجارب حسب التصميم المبين في الشكل (2) بحيث استخدم الـ MMC بتركيز 0.005 ملغم/ مل . تبعها عملية زرع الاويديا حسب التصميم المبين في الشكل (1).

فعالية تثبيط المستخلص المائي للثوم للمطفر مايتوماسين -C

لقد تم استخدام معدل الطفرة الجين HGPRT كدليل وراثي يشير الى الفعالية التثبيطية للمستخلص تجاه المطفر مايتو مايسين -C وتم حساب نسبة التثبيط حسب طريقة (10) ووجد بأن الثوم اظهر افضل كفاءة تثبيطه لدى معاملة مستخلصه قبل المطفر.

التحليل الاحصائي

لقد تم تنفيذ التجارب حسب التصميم العشوائي الكامل (CRD) و اجرى التحليل الاحصائي للبيانات المتحصل عليها بأستخدام البرنامج الاحصائي (SAS) Statitical Analysis System و استخدام اختبار دانكن (11) لتحديد الفروقات بين متوسطات العاملات و على مستوى(0.05)

النتائج

عزل الطافرات المقاومه للمضاهئ 8-ازوجوانين

يوضح الجدول (2) كيفية توزيع اعداد الطافرات المقاومة للمضاهىء 8-ازوجوانين التلقائية و المستحثة ولكلا السلالتين البريتين H1,Bc9 .

مستوى مقاومة الطافرات للمضاهئ 8-ازوجوانين

يظهر الجدول رقم (3) بأن الطافرات المقاومة بكلا نوعيها المستحثة و التلقائية بناءاً على قدرتها على النمو بوجود تراكيز متدرجة من المضاهىء والتي قسمت على اربعة مجاميع مظهرية.

اختبار قدرة الطافرات على استعمال البيورينات ونواتج تكسرها كمصادر وحيده للنتروجين في وسط النمو

يبين الجدول (4) أن الطافرات المشتقة من السلالتين قد انقسمت على مجموعتين استناداً الى نمط نموها على الاوساط التفريقية ، فهناك الطافرات التي استطاعت الاستفادة من كل مصادر النتروجين المتيسرة في الوسط SNC بما في ذلك الجوانين و الهيبوزانثين والتي ضمت طافرات المجموعة المظهرية الثانية و الثالثة و الرابعة ، اما المجموعة الثانية فضمت الطافرات التي لم تستطع الاستفادة من الجوانين و الهيبوزانثين كمصادر وحيدة للنتروجين على الوسط SNC و ضمت المجموعة المظهرية الاولى.

اختبار قدرة الطافرات على النمو على الوسط HAT

قسمت الطافرات على مجموعتين على اساس نموها او عدمه على الوسط HAT الجدول (5) . فالقسم الاول ضم طافرات المجموعة المظهرية الاولى لطافرات السلالتين Bc9و H1 التي فشلت في النمو على الوسط HAT مما يشير بأن هذه الطافرات تمتلك خللا في الجين المشفر من الانزيم HGPRT ، اما المجموعة الثانية فهذه ضمت طافرات المجموعة المظهرية الثانية و الثالثة و الرابعة من طافات السلالتين BC9، H1 و التي نجحت في النمو على الوسط HAT.

اختبار السيادة

يلحظ في الجدول (6) أن جميع ثنائيات النوى المعمولة بين السلالة البرية Bc9 وطافرات H1 و كذلك بين السلالة البرية H1 و طافرات Bc9 قد اعطت استجابة سالبة على الوسط الحاوي على المضاهيء مقارنة بنموها الموجب على الوسط NCM الخالي منه . ان هذه النتيجة تشير الى ان الطافرات المقاومة متنحية بالنسبة لأليلاتها البرية و كما يلحظ من الجدول ذاته بأن ثنائي النوى المعمول بين السلالتين البريتين قد نما على الوسط NCM و فشل في النمو على الوسط الحاوي على المضاهئ مما يشير الى ان السلالتين حساستان لهذا المضاهئ .

اختبارات التتام

يبين الجدول (7) بأن الطافرات الاختبارية المعزولة كانت متشابه في سلوكها للطافرة الاصلية التي اشتقت عنها . و يبين الجدول (8) و (9) بأن ثنائي النوى المعمول بين كل طافرة اختبارية و الطافرات التي الى نفس مجموعتها المظهرية قد اعطى نمواً موجباً . اي عدم حصول تتام مما يؤكد كون كل طافرة اختبارية هي اليلية بالنسبة لطافرات مجموعتها المظهرية كما أن ثنائي النوى المعمول بين كل طافرة اختبارية من طافرات Bc9 و طافرات المجاميع المظهرية الاخرى (عدا مجموعتها المظهرية) قد اخفق في النمو على الوسط الانتقائي الحاوي على المضاهئ 8- ازوجوانين جدول (8) مما يشير الى حدوث تتام ومن ثم الاستنتاج بأن كل طافرة اختبارية غير اليلية بل انها جينية بالنسبة لطافرات المجاميع المظهرية التي لا تنتمي اليها . و تشير هذه النتيجة الى وجود في الاقل اربعة جينات مسؤولة عن مقاومة للمضاهئ 8- ازوجوانين في طافرات السلالة البرية Bc9 .

اما ثنائي النوى المعمول بين كل طافرة اختبارية من طافرات H1 و طافرات المجاميع المظهرية الاخرى (عدا مجموعتها المظهرية) قد اخفقت في النمو على الوسط NCM الحاوي على 8- ازوجوانين الجدول (9) بأستثناء تشابه اختبارات التتام لكل من الطافرتين الاختباريتين AZG87a ، AZG114a (المجموعة الثانية و الثالثة على التوالي) و يستنتج من ذلك بأن طافرات المجموعتين الثانية و الثالثة اليلية و الى كونها جينية مع طافرات المجموعتين الاولى و الرابعة ، وتشير هذه النتائج الى وجود في الاقل

ثلاثة جينات مسؤولة عن المقاومة ضد المضاهئ 8- ازوجوانين في طـافرات السـلالة البرية H1 .

يبين الجدول (10) بأن ثنائي النوى المعمول بين كل طـافرة مـن طـافرات H1 و طافرات المجاميع المظهرية الاخرى للسلالة Bc9 (عدا مجموعتها المظهرية) قد اخفـق في النمو على الوسط الانتقائي الحاوي على المضاهئ 8- ازوجوانين بأسـتثناء تشـابه نتائج اختبارات التتام لكل مـن طـافرتي السـلالة البريـة H1 AZG87 , AZG114 (اللتين تنتميان الى المجموعة المظهرية الثانية و الثالثة على التـوالي). و توكـد هـذه النتائج بأن طافرات المجموعتين المظهريتين الثانية والثالثة للسلالة البريـة H1 هـي اليلية و الى كونها جينية مع طافرات المجاميع المظهرية الاولى و الثالثة و الرابعة مـن طافرات السلالة Bc9 .

هذا فضلاعن ان ثنائي النوى المعمول بين كل طافرة من طافرات Bc9 و طافرات المجاميع المظهرية الاخرى للسلالة H1 (عدا مجموعتها المظهرية) قد اخفق في النمو على الوسط NCM الحاوي على 8- ازوجوانين بأستثناء اختبـارات التتـام للطـافرة AZG65 حيث اظهرت اخفاقاً تاما لنمو ثنائيات النوى بينهـا و بـين جميـع طـافرات المجموعة الاولى و الثانية والثالثة و الرابعة .

نستدل من نتائج الجدول (10) بأن الطـافرات AZG78 الممثلـة للمجموعـة الاولـى للسلالة H1 و الطافرات AZG63 الممثلة للمجموعة الاولى للسلالة Bc9 تحملان جينا واحدا نرمز له *azgr*-1 حسب قواعد التسمية في الفطر *Coprinus* (12). اما الطافرتان AZG78 و AZG114 الممثلتان للمجموعة الثانية و الثالثة على التوالي للسـلالة H1 و الطافرة AZG15 الممثلة للمجموعة الثانية من طافرات السلالة Bc9 فيتحكم في صفة مقاومتها جين واحد نرمز له azgr-2 و الطافرة AZG65 الممثلة للمجموعة الثالثة مـن طافرات Bc9 اعتبرت ممثلة للجين *azg*^{r}-3 و بنفس الطريقة اطلق الرمز azg^r-4 على الجين الرابع المقاوم للمضاهئ وذلك من خلال تحليل نتائج التتام بين الطـافرة AZG96 التابعة للمجموعة المظهرية الرابعة للسـلالة H1 وبـين الطـافرة AZG70 التابعـة للمجموعة المظهرية الرابعة للسلالة Bc9 ، حيـث تمثـل المجموعـة الرابعـة لكـلا السلالتين Bc9 و H1 جيناً مقاوما واحدا.

وهكذا نجد أن اربعة جينات تشخص للمرة الاولى في الفطر *Coprinus* تتحكم في صفة المقاومة وهي *azg*^{r}-1، *azg*^{r}-2، azg^r-3، و^{azgr}-4 ثلاثة منها *azg*^{r}-1، *azg*^{r}-2، 4-*azg*^{r} مشتركة في طافرات السلالتين Bc9 وH1 بينما انفرد الجين *azg*--3 في طافرات السلالة Bc9 فقط.

تعيين موقع الجين *Azgr-1* او الجين HGPRT

يبين الجدول(11) نتائج تحليل نسبة الاتحادات الجديدة بأستخدام مربع كاي ، حيث وجد بأن الموقع الجيني *azg*^{r}-1 يظهر ارتباطا مع الجين B الواقع على المجموعة الارتباطية الثانية و يبعد عنه بمسافة 28 وحدة خريطة .(الشكل 3).

اختبار التركيز الامثل للمستخلص المائي للثوم :

عند معاملةالاويديا بتراكيز مختلفة و متدرجة من المستخلص المائي للثوم لوحظ انخفاض في حيوية هذه السبورات مع زيادة التركيز ، اما بالنسبه لمعدل الطفره فعلى الرغم من انخفاض معدلاتها مع زيادة التراكيز الا انها لم تختلف معنوياً عن السيطرة السالبة الافي التراكيز 4% و5%و10%و كما موضح في الجدول (12) .

و من خلال ما تقدم فقد تم انتقاء التركيز الامثل الذي حصلنا عليه من خلال اعلى نسبة لحيوية الاويديا و كان 1% (الحيوية (96.33%) و الذي لم يختلف معدل طفرته التلقائية معنوياً عن معدل طفرة السيطرة السالبة .

تأثير التداخل بين مستخلص الثوم و المطفر MMC

أ- تأثير التداخل في حيو ية السبورات اللاجنسية (الاويديا): ان المعاملة بالتركيز الامثل لمستخلص الثوم وقبل المعاملة بالمطفر ادى الى رفع حيوية السبورات اللاجنسية الى قرابة 73.33% مقارنة بالسيطرة الموجبة و التي بلغت حيويتها قرابة 55.33% الان معاملة الاويديا (مع و بعد) المطفر لم ترفع معدل حيوية الاويديا الى المستوى المعنوي فقد بلغتا61.00% و 55.00% على التوالي و كما موضح في الجدول (13).

ب- تأثير التداخل في معدل طفرة الجين HGPRT عند معاملة الاويديا بالمطفر MMC فأن معدل طفرة الجين HGPRTالتلقائي قد ارتفع من (2.00) (سيطرة سالبة) الى 12.33 (سيطرة موجبة) بحيث كان الفرق معنوياً ($P < 0.05$) و عند اجراء التداخل ما بين مستخلص الثوم و المطفر فأن ذلك ادى الى خفض معدل تردد الطفرة الى (6.33)

مقارنة بالسيطرة الموجبة حين معاملة الاويديا بمستخلص الثوم قبل معاملتها بالمطفر بحيث كان الفرق معنوياً كما ادى الى خفض معدل الطفرة الى (11.00) و (11.33) في كلتا المعاملتين مع وبعد المطفر على التوالي لكن لم يصل هذا الانخفاض الى مستوى المعنوية مقارنة بالسيطرة الموجبة لاحظ جدول (13) .

يشير الجدول (13) بأن مستخلص الثوم اظهر افضل كفاءة تثبيطية للمطفر مايتوماسين -C لدى معاملة مستخلصه قبل المطفر حيث بلغت (73.33%).

المناقشة

يعد عزل وتشخيص طافرات HGPRT في السبورات اللاجنسية (الاويديا) للسلالتين البريتين Bc/6.6و H1/5.5 في الفطر البازيدي *Coprinus cinereus* والتي تمتلك صفة المقاومة للمضاهيء القاعدي 8- آزوجوانين ،ذو اهمية ومكانة خاصة في الدراسات الوراثية (13).حيث يمثل تشخيص طفرة HGPRT في اويديا الفطر *Coprinus* استحداثا لنوع من الاختبارات الوراثية القصيرة الامد Shout-term genetic tests ذات الفائده في تحديد المطفرات والمسرطنات البيئية و بالامكان ايضا استخدامها للكشف عن مضادات تلك المسرطنات والمطفرات وذلك بالكشف عن قدرة تلك الكيمياويات على استحتاث معدل طفرة الجين HGPRT وتأتي اهمية الكشف عن مثل تلك المركبات المسرطنة او الكشف عن مركبات طبيعية غير مكلفة اقتصاديا يمكنها ان تحد من فعلها المسرطن مع ازدياد تلوث البيئة العراقية بالعديد من المسرطنات والمطفرات الكيميائية. هذا فضلا عن ان مثل هذا الاختبار امكن استحداثه في الفطر البازيدي *Coprinus* الذي يعد من الفطريات الراقية سهلة التربية في ظروف المختبر و اوساطه الغذائية غير مكلفة اقتصادياً و الذي يجمع بين خصائص البكتريا في سهولة التعامل مع سبوراته وحيدة النواة وبين خصائص الاحياء العليا لكونه من حقيقات النواة.

وبأعتماد اختبار طفرة الجين HGPRT في اويديا السلالة AZG78 المشتقة عن السلالة البرية AZGH1/5.5 ارتأينا ان نختبر قدرة المستخلص للثوم في الحد من الاثر الوراثي السام للمطفر مايتوماسين -C حيث وجد ان التركيز 1% حين معاملته مع المطفر و قبله كان كافياً للحد من الفعل للمطفر للمايتو مايسين -C و ذلك بخفض معدل

طفرة الجين HGPRT في اويديا الفطر. ان هذه النتيجة تشير وبوضوح الى ان مستخلص الثوم يحوي على بعض المركبات الفعالة التي قد تكون ذات شأن كعقار مضاد للسرطان فهو يمتلك عدد من المركبات ذات القدرة على تحوير عمل مجموعة من انزيمات الاكسدة التي تكون ذات فعالية في ايض المركبات الغريبةXenobiotics (14) كذلك يعتقد بان مركبات الثوم يمكن ان تستحث النظام الانزيمي للمرحلة الثانية للتحول البايولوجي للمثبطات (15) فقد وجدان المركب الكبريتي Diallylsulfide (DAS) وهو احد مركبات الثوم يثبط فعل المطفر 2-dimethylhydrazine و1 الذي يستحث سرطان القولون والكبد في الحيوانات (16) وهذا فضلا عن احتواء المستخلص على فيتامين A,B1, B2 (17) وعلى الفيتامين C (18) ومن المعروف بان فيتامين C,A تقع ضمن العناصر الغذائية الدقيقة Micronutrients ذات القابلية المضادة للتاكسد Antioxidant (19) فقد سجل العديد من الباحثين قدرة فيتامين Cعلى تثبيط المطفر وفي معظم الانظمة الحياتية ، فهو مثبط عام للمطفر General antimutagen هذا فضلا عن السلينيوم الموجود ضمن مركبات الثوم يظهر فعل مضاد للمطفرات والمسرطنات ويعتقد بانه ذو فعل وقائي ضد الجذور الحرة نظراً لقابليته على تحفيز الانزيمات ذات القابلية على اكتساح تلك الجذور وكذلك تفعل مضادات الاكسدة Antioxidant في غذائنا كما وجد ان عنصر السلينوم والمركبات الكيميائيه المشتقة عنه يمكنها ان تثبط فعل بعض المركبات الكيميائية المسرطنة وتثبيط الاورام (20) .

المصادر

1 . Ramel , C.; Alekperov, U. K. ; Ames, B. N. ; Kada, T. and Wattenberg, L.W. (1986). Mutation Res., 168:47-65.

2. Wakabayashi, K.; Nagao, M. ; Esumi, H. and Sugimura, T.(1992). Cancer Res . 52:2092s- 2098s.

3. Amcs,B .N. (1979). Science 204:587-593.

4. Stewart, G. R. and Moor, D. (1974). Gen. Microiol.83:73-81.

5. Katy, N. S. O. (1979). Allelic recombination in *Coprinus*: Variability and genetic control of recombination frequency. Ph.D. thesis, University of Manchester . U.K.

6. Anderson , G.E. (1971). The life history and genetic of *Coprinus lagopus*, a practical introduction to biochemical genetics. Harris Biological Supplies pp.63.
7. Smith, J.E. and Berry, D.R. (1978). The filamentous fungi .Vol. 3. Deward Arnold. London.
8. Moor, D. (1973). Genet . Res., 22: 187-193.
9. Whong, W.L. (1979). Mutat .Res., 60 : 301- 312.
10. Madrigal – Bujaider, E. and Diaz – Barriga, S. (1995). J. Med. Sci. Res., 23: 63 – 64.
11. Duncan, D.B. (1955). Multiple range and multiple F test.Biometrics.,11:1-42.
12. North, J. (1982). Gen.Microbiol.,128:2747-27 resistance 53.
13. Mohammed,B.M. Studying the resistance mutants of the analogue 8- azaguanine in *Coprinus cinereus* .M.Sc. Thesis, University of Baghdad ,College of Ibn AL- Haitham . (1989)
14. Wargovich, M.J. and Goldberg, M. T.(1985). Mutate. Res., 143 :127- 129.
15. Sparnins, V. L.; Barang, G. and Wattenberg , L.W. (1988). Carcinogenesis., 2:131- 134.
16 . Wargovich , M. J . (1987). Carcinogensis., 8:487-489.
17. Hussein, F.T.K. (1985). Medicinal plants in Libya, Arab Encyclopedia house. pp.224.
18. Chakravaty, H. L. (1976). Plant wealth of Iraq (a dictionary of economic plants)vol. 1.Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Baghdad .pp.505.
19. Wesiburger, J. H.(1997). Vitamins and disease prevention : Update on optimal in takes .in : J.W. Finley ; D.J. Armstrong ; S.Nagy and Robinson (Eds) Hypernutritious foods . Agscience , INC, Florida . PP5.5-68.
20. IP, C.J. AM.(1986). Coll. Toxicol . 5:7-20.
21. North, J. (1987). Linkage map of Coprinus cinereus in:Genetic map ;A comiation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. Ed. S. J. O Brrien. Cold spring harbor laboratory .Vol.4.P.340-345.

جدول (1) التركيب الجيني لثنائيات النوى المعمولة بين السلالات الاختبارية و بين الطافرات المشتقة من السلالتين البريتين Bc9 و H_1

ثنائيات النوى	التركيب الجيني لثنائيات النوى
ZR.388X AZG63	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A6 B6
ZR.388X AZG15	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A6 B6
ZR.388X AZG65	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A6 B6
ZR.388X AZG70	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A6 B6
ZR.388X AZG78	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A5 B5
ZR.388X AZG114	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A5 B5
ZR.388X AZG87	*azg*^{s} ftr$^-$ A40 B40 x *azg*- ftr$^+$ A5 B5
ZR.18X AZG96	*azg*^{s} ftr$^-$met$^-$ A6 B6 x ftr$^+$met$^+$ A5 B5

الرمز ftr يشير الى عم قدرة السلالة على استخدام الفركتور كمصدر وحيد للكاربون.

الرمز met-5 يعبر عن الحاجة الى الميثايونين.

A6 B6, A5 B5, A40 ,B40 تعبر عن اليلات التزاوج.

جدول (2) توزيع الطافرات المستحثة والتلقائية للمضاهيء القاعدي -8 آزوجوانين لكلا السلالتين H_1/5.5 , Bc9/6.6

السلالة	نوع الطفرة	رقم السلالة الطافرة
Bc9/6.6	تلقائية	*Azg1-Azg61*
	مستحثة بالضوء فوق البنفسجي	*Azg2-Azg75*
H_1/5.5	تلقائية	*Azg76-Azg86*
	مستحثة بالضوء فوق البنفسجي	*Azg87-Azg115*

جدول(3) يبين كيفية توزيع اعداد الطافرات التلقائية و المستحثة بالضوء فوق البنفسجي على الوسط NCM مضافاً اليه التراكيز 250,200,150,100,50 مايكروغرام/مل من المضاهيء8- آزوجوانين ، حيث توزعت هذه الطافرات الى اربع مجاميع مظهرية ، المجموعة الاولى شملت عدد من الطافرات التي نجحت في النمو على جميع تراكيز المضاهيء على نحو جيد . اما المجموعة الثانية فضمت الطافرات ذات النمو الضعيف على التركيزين 250,200 مايكروغرام /مل من 8- آزوجوانين و المجموعة الثالثة فضمت الطافرات التي أبدت نموا ضعيفا على التراكيز 250,200,150 مايكروغرام من المضاهيء المجموعةالرابعة و تشمل على الطافرات التي فشلت في النمو تماما على التراكيز 150,200,250 مايكروغرام من المضاهيء السام

السلالة	عدد طافرات المجموعة(1)		عدد طافرات المجموعة (2)		عدد طافرات المجموعة (3)		عدد طافرات المجموعة (4)	
	تلقائية	مستحثة	تلقائية	مستحثة	تلقائية	مستحثة	تلقائية	مستحثة
Bc9/6.6	19	4	18	-	21	1	3	9
H_1/5.5	8	11	3	4	-	11	-	3

جدول (4) قدرة السلالتين البرتين وطافراتهما على استغلال مواد الزانثين (x) والهيبوزانثين (HX) والالنتوين (AL) والادنين (A) وحامض اليوريك (UA) والكوانين (G) كمصادر وحيدة للنتروجين في وسط النمو SNCالخالي من كلوريد الامونيوم

السلالة الابوية	نوع الطافرة	المجموعة المظهرية	رقم الطافرة	NCM	SNC	*النمو على SNC مضافا لها					
						X	HX	AL	A	UA	G
Bc9			w.t	+	-	+	+	+	+	+	+
=	تلقائية	اولى	AZG8,10,12,14,17-19,34,37,38,41,41,47,48,52-55,59,60,	+	-	+	-	+	+	+	-
=	مستحثة	-	AZG63,68,69,72,	+	-	+	-	+	+	+	-
H_1			w.t	+	-	+	+	+	+	+	+
=	تلقائية	اولى	AZG76,77,78,79,80,81,84,85	+	-	+	-	+	+	+	-
	مستحثة	-	AZG89,94,97,98,100,102,103,108,110,113,115	+	-	+	-	+	+	+	-
Bc9	تلقائية	ثانية	AZG2-4,7,9,51,20,24,25,27,28,36,39,44,45,51,61,	+	-	+	+	+	+	+	+
=	مستحثة	-	لايوجد								
H_1	تلقائية	-	AZG82,83,86,	+	-	+	+	+	+	+	+
=	مستحثة		AZG91,105,112,114	+	-	+	+	+	+	+	+
Bc9	تلقائية	ثالثة	AZG1,6,11,13,16,21,22,23,26,13,33,35,40,42,43,46,49,50,56,57, 58	+	-	+	+	+	+	+	-
	مستحثة	-	AZG65	+	-	+	+	+	+	+	+
H_1	تلقائية	-	لايوجد								
	مستحثة	-	AZG87,90,92,93,95,99,101,104,106,107	+	-	+	+	+	+	+	+
Bc9	تلقائية	رابعة	AZG5,29,32	+	-	+	+	+	+	+	+
=	مستحثة	-	AZG 62,64,66,67,70,71,73,74,75	+	-	+	+	+	+	+	+
H_1	تلقائية	-	لايوجد								
=	مستحثة	-	AZG 88,96,111	+	-	+	+	+	+	+	+

W.T: سلالة برية

+:نمو -:عدم نمو

*:جميع اوساط النمو مضافا لها الكلكوز بتركيز نهائي قدره 5 ملي مول/مل

الجدول(5) اختبار قدرة السلالتين البريتين و طافراتهما على النمو على الوسطHAT ومشتقاته

السلالة الابوية	نوع الطفره	المجموعة المظهرية	رقم الطافرة	NCM	*النمو على SNC مضافا اليه						
					H	T	A	H+T	H+A	A+T	HAT
Bc9			w.t	+	+	+	±	+	±	–	+
BC9	تلقائية	اولى	AZG8,10,12,14,17-19,34,37,38,41,41,47,48,52-55,59,60,	+	+	+	-	+	–	–	–
=	مستحثة	=	AZG63,68,69,72,	+	+	+	-	+	–	–	–
H_1			w.t	+	+	+	±	±	±	–	+
=	تلقائية	اولى	AZG76,77,78,79,80,81,84,85	+	+	+	-	+	–	–	–
	مستحثة	=	AZG89,94,97,98,100,102,103,108,110,113,115	+	+	+	-	+	–	–	–
Bc9	تلقائية	ثانية	AZG2-4,7,9,51,20,24,25,27,28,36,39,44,45,51,61,	+	+	+	±	+	±	–	+
=	مستحثة	=	لايوجد							–	
H_1	تلقائية	=	AZG82,83,86,	+	+	+	±	±	±	–	+
=	مستحثة		AZG91,105,112,114	+	+	+	±	±	±	–	+
Bc9	تلقائية	ثالثة	AZG1,6,11,13,16,21,22,23,26,13,33,35,40,42,43,46,49,50,56,57,58	+	+	+	±	±	±	–	+
	مستحثة	ثالثة	AZG87,90,92,93,95,99,101,104,106,107,109	+	+	+	±	±	±	–	+
BC9	تلقائية	رابعة	AZG5,29,32	+	+	+	±	±	±	–	
=	مستحثة	=	AZG62,64,66,67,70,71,73,74,75	+	+	+	±	±	±	–	+
H_1	تلقائية	=	لا يوجد							–	
=	مستحثة	=	AZG88,96,111	+	+	+	±	±	±	–	+

+:نمو

–:عدم نمو ±:نمو ضعيف

±:نمو ضعيف* :جميع اوساط النمو مضافا لها الكلكوز بتركيز نهائي قدره 5 ملي مول/مل

جدول(6) نمو ثنائيات النوى(Dikaryons) المعمولة بين السلالتين البريتين من جهة و بين الطافرات و السلالتين البريتين من جهة اخرى على المضاهئ 8- آزوجوانين

ثنائي النوى	*النموعلى	
	NCM	NCM+8-ازاجوانين
$H_1/5.5$ مع Bc9/6.6	+	-
$H_1/5.5$ مع جميع الطافرات Bc9/6.6	+	-
Bc9/6.6 مع جميع طافرات $H_1/5.5$	+	-

+:نمو

-:عدم نمو

*:جميع اوساط النمو مضافا لها الكلكوز بتركيز نهائي قدره 5 ملي مول/مل

جدول (7) اختبار قدرة الطافرة الاختبارية على النمو على تراكيز مختلفة من المضاهي 8- آزواجوانين وقدرتها على النمو الوسط HAT واستغلال الهيبوزانثين (HX) والكوانين (G) كمصادر وحيدة للنتروجين في وسط النمو ، واختبار قدرة الطافرات الاختبارية على النمو على الفركتوز والميثايونين مع ارجاع الطافرات الى المجاميع المظهرية للطافرات مع التركيب الجيني لها

رقم الطافرة الاختبارية	المجموعة المظهرية	NCM *	NCM* +8- ازوجوانين				* NCM	NCM* HAT+	* NCM	* SNC	+SNC*		+NCM		التركيب الجيني للطافرات الاختبارية
			100	150	200	250					HX	G	فركتوز	ميثايونين	
AZG63a	الاولى	+	+	+	+	+	+	-	+	–	–	–	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG15a	الثانية	+	+	+	±	±	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^-$ met$^+$ A40 B40
AZG65a	الثالثة	+	+	±	±	±	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG70a	الرابعة	+	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG78a	الاولى	+	+	+	+	+	+	–	+	–	–	–	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG114a	الثانية	+	+	+	±	±	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG87a	الثالثة	+	+	±	±	±	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^+$ met$^+$ A40 B40
AZG96a	الرابعة	+	+	–	–	–	+	+	+	–	+	+	+	+	azg^r Frt$^-$ met$^+$ A6 B6

+ :نمو – : عدم نمو ± : نمو ضعيف

* : الاوساط في الحقول مضافا لها الكلكوز بتركيز نهائي قدره 5 ملي مول / مل

جدول (8) اختبار التتام لثنائيات النوى المعمولة بين طافرات السلالة Bc9 و طافراتهـا الاختبارية

المجموعة المظهرية	نوع الطفرة	رقم الطافرة	الطافرات الاختبارية			
			AZG63a	AZG15a	AZG65a	AZG70a
الاولى	تلقائية	AZG18	+	-	-	-
	-	AZG37	+	-	-	-
	مستحثة	AZG63	+	-	-	-
	-	AZG72	+	-	-	-
الثانية	تلقائية	AZG2	-	+	-	-
	-	AZG 15	-	+	-	-
	-	AZG 44	-	+	-	-
	-	AZG61	-	+	-	-
الثالثة	تلقائية	AZG11	-	-	+	-
	-	AZG26	-	-	+	-
	-	AZG56	-	-	+	-
	مستحثة	AZG5	-	-	+	-
الرابعة	تلقائية	AZG5	-	-	-	+
	-	AZG29	-	-	-	+
	-	AZG32	-	-	-	+
	مستحثة	AZG62	-	-	-	+
	-	AZG70	-	-	-	+
	-	AZG75	-	-	-	+

+: نمو -:عدم نمو

جدول (9) اختبار التتام لثنائيات النوى المعمولة بين طافرات السلالة H_1

المجموعة المظهرية	نوع الطفرة	رقم الطافرة	الطافرات الاختبارية			
			AZG78a	AZG114a	AZG87a	AZG96a
الاولى	تلقائية	AZG77	+	–	–	–
	–	AZG78	+	–	–	–
	–	AZG81	+	–	–	–
	–	AZG85	+	–	–	–
	مستحثة	AZG108	+	–	–	–
	–	AZG115	+	–	–	–
الثانية	تلقائية	AZG83	–	+	+	–
	–	AZG86	–	+	+	–
	مستحثة	AZG105	–	+	+	–
	–	AZG114	–	+	+	–
الثالثة	مستحثة	AZG 87	–	+	+	–
	–	AZG93	–	+	+	–
	–	AZG99	–	+	+	–
	–	AZG107	–	+	+	–
	–	AZG109	–	+	+	–
الرابعة	مستحثة	AZG88	–	–	–	+
	–	AZG96	–	–	–	+
	–	AZG111	–	–	–	+

+: نمو –:عدم نمو

جدول(10) اختبار التتام لثنائيات النوى المعمولة بين طافرات السلالة Bc9 و طافرات السلالة البرية H_1

المجموعة المظهرية	طافرات Bc9	المجموعة الاولى	المجموعة الثانية	المجموعة الثالثة	المجموعة الرابعة
	طافرات IH	AZG63	AZG15	AZG65	AZG70
الاولى	AZG78	+	–	–	–
الثانية	AZG114	–	+	–	–
الثالثة	AZG87	–	+	–	–
الرابعة	AZG96	–	–	–	+

+: نمو –:عدم نمو

جدول(11) نتائج التحليل السبوري العشوائي للسبورات الجنسية الناتجة عن التضريب ZR388 X AZG78

الزوج الجيني	المجموعة الارتباطية	عدد السبورات	عدد التشكيلات الجديدة	التركيب الجيني للتشكيلات الجديدة	عدد التشكيلات الابوية	التركيب الجيني للتشكيلات الابوية	القيمة الجدولية x2=0.05	القيمة الناتجة x20.05
A,azg^r	I	100	58	azg^rA40 azg^sA5	42	azg^rA5 azg^sA40	7.815	2.56
B,azg^r	II	100	28	azg^rB40 azg^sB5	72	azg^rB5 azg^sB40	7.815	19.36
ftr,azg^r	VII	100	51	frt^+azg^s $ftr\,azg^r$	49	frt^+azg^r $ftr\,azg^r$	7.815	0.04

X^2 قيم مربع كاي

ولمعرفة بقية الرموز راجع الجدول (6)

جدول(12)الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري و الخطأ القياسي لمعدل طفرة الجين HGPRT و لمعدل عدد ا لآويديا الحية في السبورات اللاجنسية للفطر *Coprinus cinereus* المعاملة بمستخلص الثوم بتراكيز مختلفة

تراكيز مستخلص الثوم المائي%	معدل طفرة الجين $x\ 10^{-6}$HGPRT		معدل عدد الاويديا الحية $\%x10^{-3}$	
	الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري X´ ±S.D	الخطا القياسي S.E	الوسط الحسابي ±الانحراف المعياري X´ ±S.D	الخطا القياسي S.E
0.25	00.66±0.58	0.34	31.3±7.77+	4.57
0.5	1.00±0.00	0.00	54.33±11.06+	6.51
1.0	2.00±0.00	0.00	96.33±5.13	3.02
1.5	1.67±0.58	1.34	83.33±12.58	7.40
2	1.00±0.00	0.00	65.00±12.29+	7.23
3	0.33±0.58	0.39	25.00±6.56+	3.86
4	0.00±0.00*	0.00	11.00±2.00+	1.18
5	0.00±0.00*	0.00	5.33±1.15+	0.68
10	0.00±0.00*	0.00	0.0±0.0+	0.00
السيطرة السالبة(PBS)	2.00±0.82	0.48	108.00±3.00	1.76
السيطرة الموجبة (MMC)	12.33±1.53	0.98	55033±2.52	1.48

+اختلاف معنوي بمستوى P<0.05 * اختلاف معنوية بمستوى P<0.01

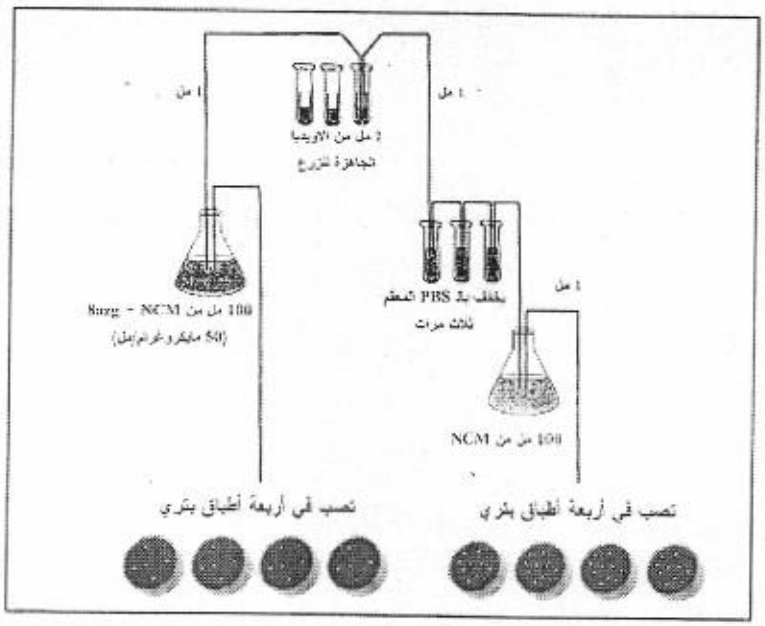
mitomycin-c : MMC Phosphate Buffered Saline :PBS

جدول (13) الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري والخطا القياسي لمعدل طفرة الجين HGPRT ولمعدل عدد الاويديا في السبورات اللاجنسية للفطر *Coprinus cinereus* لدى تداخل مستخلص الثوم المطفر MMC بالمعاملات الثلاث (قبل،بعد و مع) المطفر

نوع المعاملة	معدل طفرة الجين $x10^{-6}$ HGPRT		معدل عدد الاويديا الحية $\%\ x\ 10^{-3}$	
	الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري X ±s. D	الخطا القياسي S.E	الوسط الحسابي ±الانحراف المعياري X±S.D	الخطا القياسي S.E
بدون معاملة (مستخلص الثوم)	2.00 ±0.00*	0.00	96.33 ±5.13*	3.02
قبل المعاملة	6.33±1.53+	0.90	73.33±4.93+	2.90
بعد المعاملة	11.33 ±1.53	0.90	55.00±7.00	4.12
مع المعاملة	11.00 ±1.73	1.02	61.00±3.61	3.51
السيطرة السالبة(PBS)	2.00 ±1.00	0.59	108.00±3.00	1.76
السيطرة الموجبة (MMC)	12.33±1.53	0.90	55.33±2.52	1.48

+اختلاف معنوي بمستوى P<0.05 * اختلاف معنوية بمستوى P<0.01

MITOMYCIN-C : MMC Phosphate Buffered Saline



شكل (1) مراحل عملية زرع الأويديا

الشكل (2)تصميم التجارب التي اجريت لبيان اثر تداخل المطفر MMC مع مستخلص الثوم في نظام *Coprinus cinereus*

A New Biological System For Detecting Environmetal Carcinogens And /Or Mutagenes And Their Adversary

B. M. A. Mohammed , N. Sh. Katy
Department of Biology, College of Education Ibn Al-Haitham, University of Baghdad.

Abstract

A new test system for detecting environmenl carcinogenes and/or mutagenes and their adversary It has been induced. One hundred and fifty mutants were isolated from the basidiomycete fungus *Coprinus cinereus* which were resistant to guanine analogue 8- azaguanine .All the spontaneous and induced with UV light origin mutants were isolated from the wild type strains Bc9/ 6.6 and H_1/5.5 .These mutants were tested on selective medium containing different concentrations of the analogue and also to their ability to use purine bases and their degredated products as a sole nitrogene source were tested ; and their ability to grow on HAT medium was tested . According to the results obtained from these tests; mutants were classified into four phenotypic groups for each wild –type strain .

All the 8-azaguanine resistant mutants were dikaryotized with compatible wild strains. The dikaryons produced were unable to grow on medium containing 8-azaguanine which establish the recessiveness of the mutations to their respective wild-type alleles.

Complementation test determind four genes which controll the resistance to 8- azaguanine in Coprinus cineres .These genes were designated *azg^r-1, azg^r-2, azg^r-3, azg^r-4*.Three of these genes *azg^r-1, azg^r-2* and *azg^r-4*were carried by Bc9/6.6 and H1/5.5 mutants . While, *azg^r-3* gene was found in Bc9/6.6 mutants only.

These genes are determind for the first time in fungus coprinus cinereus .

Mutants which carry *azg^r*-1 gene were characterized by their inability to use hypozanthine and guanine as a sole nitrogen source in the medium ; their failure to grow on HAT medium and their resistance to all concentrations of 8- azaguanine used.This gene is considered to

represent a mutation led to lose or modify the specificity of the enzyme hypoxauthine –guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT) which play an important role in transferring hypoxauthine and guanine to their nucleotides by salvage pathway .

Spore analysis indicated that *azg*^{r}-1 gene locted in linkage group II ,since it gave a distance of 28 map units with the mating type gene B .

The assessment of the cytotoxic , mutagnic and antimutagenic role of the aqueous extract of garlic (*Allium sativum* L.) against the genotoxic effect of mitomycin - C

(MMC) evaluate the ability of the mutagen to induce mutation in HGPRT gene by using the asexual spores (oidia)of *Copninus cinereus* for the strain AZG78 and by depending on the viability and mutation rate in HGPRT gene test .To assess cytotoxity and mutagenecity of garlic extract , gradual concentrations were prepared . The concentration of choice was considered with respect to two factors ; high survival rate and low mutagenic activity (similar to negative control). To examine the antimutagenic effects of the extract, an interation was made between the crude extract and the mutagen MMC with respect to three kinds of treatments before , after and with mutagen . The study concentrated on two sides 1- on the toxic and /or mutagenic effect of the aqueous extract of garlic . 2 - Antimutagenic activity of the extract with respect to the mutageen MMC . However, this activity was dependent on the type of the treatment . The extract showed best antimutagenic activity when it was used before the mutagen , so itis considered as desmutagen to the genotoxic effects of MMC.

These data support the hypothesis that garlic compounds may be efficacius in preventions of cancer and also we could use the HGPRT gene as a sensitive biological system in detecting environmental mutagenes or carcinogens and their adversary .