------مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 1، ص 254-265، 2018------

التأثير التطفيري لمبيدات الأدغال Glyphosate و Paraquat و Haloxyfop-p-methyl في كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami*

هناء رمضان عبدالكريم **ساهي جواد ضاحي**

قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

(أُستلم 11/ 3 /2014 ؛ قُبل 5 /5 /2014)

الملخص

هدفت الدراسة للتحري عن قدرة مبيدات الأدغال Glyphosate، Paraquat و Haloxyfop-p-methyl على حث الطفرة النقطية في كونيدات الفطر *A.amstelodami*، وجرى مبدئياً تحديد التركيز المثبط الادنى لكل مبيد ومن ثم اختيرت ثلاثة تراكيز تحت السامة من كل مبيد، وهذه التراكيز كانت (4800, 3840, 2880 µg/ml) من Glyphosate و (400, 280, 200 µg/ml) من Paraquat و (21.6, 10.8, 4.32 µg/ml) من Haloxyfop-p-methyl، واستخدمت ثلاث معاملات مختلفة لحث الطفرة النقطية وهي المعاملة المسبقة ومعاملة التضمين في الطبق ومعاملة النمو الوسيط وذلك للبحث عن الطفرة *azgA* المقاومة للازاكوانين في السلالة البرية A1 الحساسة لهذه المادة. وفي الوقت الذي لم يظهر فيه Glyphosate تأثيراً تطفيرياً فإن المبيد Paraquat أعطى نتيجة غير قطعية إذ لم يظهر تأثيراً مطفراً بطريقتي المعاملة المسبقة والنمو الوسيط في الطبق لكنه خفض الطفرات معنوياً بطريقة التضمين في الطبق. أما Haloxyfop-p-methyl، فقد أعطى نتيجة موجبة بطريقة النمو الوسيط فيما أعطى نتيجة سالبة بالطريقتين الأخيرتين.

الكلمات الدالة: مبيدات ادغال، Glyphosate، Paraquat، Haloxyfop-p-methyl، الطفرة النقطية.

The Mutagenicity of the Herbicides Glyphosate and Paraquat and Haloxyfop-p-methyl in Conidia of the Fungus *Aspergillus amstelodami*

Hanaa R. Abd Al-Kareem **Sahi J. Dhahi**

Department of Biology/ College of Science/ University of Mosul

ABSTRACT

The study was aimed to investigating the ability of the herbicides Glyphosate, Paraquat and Haloxyfop-p-methyl to induce point mutation in conidia of the fungus *Aspergillus amstelodami*. The minimal inhibitory concentrations for the herbicides were determined and three sublethal concentrations of each herbicide was tested. They were (2880, 3840, 4800 µg/ml) for Glyphosate; (200, 280, 400 µg/ml) for Paraquat; and (4.32, 10.8, 21.6µg/ml) for Haloxyfop-p-methyl. Three protocols; pretreatment, plate incorporation and growth- mediated were used to select mutation resistant to 8-azaguanine (*azgA*) in the sensitive wild type strain A1. Glyphosate was negative in this respect and in all three protocol of mutagenesis. Paraquat, on the other hand, gave inconclusive results, where it was negative in the pretreatment and the growth-mediated methods, but it reduced the mutant frequency in the plate incorporation method. Haloxyfob-p-methyl, gave positive results in the growth mediated method and negative results in the other two protocols.

Keywords: Herbicide, Glyphosate, Paraquat, Haloxyfop-p-methyl, point mutation.

المقدمة

تعد مبيدات الأدغال من أكثر أصناف مبيدات الآفات استخداماً على مستوى العالم بهدف زيادة الإنتاج الزراعي، ولكن عند استخدامها بأسلوب غير خاضع للسيطرة فإنها تسبب تأثيرات جانبية غير متوقعة تؤثر بصورة مباشرة أو غير مباشرة على الكائنات غير المقصودة المتواجدة في النظام البيئي نفسه أو في أنظمة بيئية أخرى والتي تصل إليها هذه المبيدات عن طريق الأمطار والرياح والمياه والحراثة وغيرها. (Kortekamp, 2011; Zabaloy *et al*., 2011).

ونظراً لسعة انتشار الكيمياويات البيئية فقد حظيت بوافر البحث عن تأثيرها على الأحياء بصورة عامة وعلى الإنسان بصورة خاصة، وتعد التأثيرات الوراثية وبالذات التأثيرات المطفرة هي الأخطر، وذلك لتأخر اكتشافها، إذ لا تظهر إلا في الأجيال اللاحقة وصعوبة أو استحالة معالجة البعض منها حين الكشف عنها، وهذه التأثيرات ممكن ان تكون كبيرة الحجم (Macrolesion) وتشمل تغيرات وراثية كبيرة كأن تكون جزءاً من الكروموسوم أو كروموسوماً بأكمله أو حتى مجموعة كروموسومية كاملة، أو يكون التأثير صغير الحجم (Microlesion) إذ تتضمن جيناً واحداً أو جزءً من جين أو مجرد زوج واحد من القواعد، ويطلق على العوامل المتخصصة باحداث تأثيرات جينية في الكائنات الحية عند مستوى التعرض تحت السام (sublethal) التي تؤدي إلى ظهور خصائص وراثية مغايرة بالمواد المسممة للجين (Genotoxic) وهذه العوامل قد تكون فيزياوية أو كيمياوية والتي يمكن أن تتفاعل بسرعة مع الأحماض النووية (Brusick, 1980, 1982).

يعد اختبار Ames الذي طوره الباحث Bruse Ames في سبعينات القرن الماضي والذي يعتمد على استخدام بكتريا *Salmonella* من أوسع الاختبارات انتشاراً للتحري عن التأثيرات التطفيرية والمسرطنة للمواد الكيمياوية بصورة عامة (Prescott *et al*., 2005)، كما أن نظام الفطر *Aspergillus* يعد كذلك من الأنظمة الواسعة الاستخدام للدراسات الوراثية للمواد الكيمياوية والذي يعكس التأثيرات الوراثية لهذه المواد على الإنسان كونه كائناً مجهرياً حقيقي النواة (Kafer *et al*., 1986).

فالمبيد Glyphosate هو مبيد أدغال من مجموعة organophosphorus وهو جهازي، غير انتقائي، يستخدم بعد الإنبات للسيطرة على الحشائش الحولية وثنائية الحول ونبات البردي والأدغال عريضة الاوراق، وآلية تأثيره الرئيسة هو تثبيط صنع الأحماض الأمينية الأروماتية في مسار Shikimic acid (Kortekamp, 2011; Moreno *et al*., 2013). اما Paraquat فهو من مجموعة bipyridium يستخدم بصورة واسعة على نطاق العالم، وهو يعمل بالملامسة، غير انتقائي، سريع المفعول، يستخدم للسيطرة على مدى واسع من الأدغال، وآلية تأثيره الأساس هو تثبيطه لعملية التركيب الضوئي فضلاً عن تكوينه جذور الاوكسجين الحرة التي تؤثر على الأغشية الخلوية والمكونات الأخرى لخلية والتي قد تؤدي إلى موت الخلية (He *et al*., 2012; Banaee *et al*., 2013). أما Haloxyfop-p-methyl فهو من مجموعة Aryloxyphenoxypropionates والاسم الشائع لها (fop)، وهو جهازي، انتقائي، يستخدم بعد الإنبات للسيطرة على الحشائش الحولية وثنائية الحول في المحاصيل عريضة الأوراق، وآلية تأثيره الرئيسة هو تثبيط البناء الحيوي للأحماض الدهنية في مسار de novo (EFSA, 2009; Banas *et al*., 2012).

يهدف البحث الحالي لاختبار قدرة التراكيز تحت السامة من مبيدات الأدغال الثلاثة على حث طفرات نقطية مقاومة للعقار السام 8-azaguanine في كونيدات الفطر *A.amstelodami*.

المواد وطرائق العمل

كائن الاختبار

استعملت في الدراسة الحالية السلالة A1 البيضاء الكونيدات من الفطر *A.amstelodami* ذات النمط الجيني *wA1* (Caten, 1979).

الأوساط الرزعية وظروف النمو

إن الأوساط الزرعية وظروف النمو هي كما وصفها (Caten, 1979)، إذ استخدم وسطان زرعيان أساسيان هما الوسط الأدنى Minimal medium (M) ووسط مستخلص الشعير – ملح الطعام Malt extract-salt Medium (MTS)، ويمكن إغناء هذين الوسطين بإضافة محلول الإضافة الكاملة (Complete supplement; C) بواقع 5 مل لكل 100 مل من الوسط الزرعي وبذلك نحصل على الوسطين CM و CMTS، ولغرض الحصول على مستعمرات منفردة ومحددة النمو فقد أضيف الملح Sodium deoxycholate (D) بتركيز 400 مايكروغرام/ مل من الوسط الزرعي ليصبح الوسطان CMD و CMTSD.

المحلول الخزين لنظير الكوانين 8-Azaguanine (AZG)

حضر محلول خزين منه بتركيز نهائي مقداره 2500 مايكروغرام لكل مل وذلك بإذابة 0.25 غرام من (AZG) في أقل كمية ممكنة من محلول هيدروكسيد الصوديوم (1 N NaOH) ثم يكمل الحجم إلى 100 مل ماء مقطر (Hoffmann and Malling, 1974). عقم المحلول وحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام.

مصدر الإشعاع

مصدر الإشعاع المستخدم في هذه الدراسة هو مصباح UV من نوع (NOP 189 Scottish Science) الذي جهزته شركة (Philip Harris) الإنكليزية والذي يطلق أشعة غالبيتها بطول موجي 253.7 نانوميتر للحصول على الأشعة فوق البنفسجية قصيرة الموجة (UVC).

المبيدات

أولاً: المبيد Glyphosate

استعمل المبيد Glyphosate المجهز بهيئة مركز قابل للذوبان في الماء من شركة Monsanto السويسرية/ والحاوي على المادة الفعالة Glyphosate في صورة ملح ايزوبروبيل أمين (isopropylamine salt) بتركيز 48% (وزن/حجم)، واستخدمت التراكيز مباشرة من دون تحضير محلول خزين، ومن دون تعقيم.

ثانياً: المبيد Paraquat

استعمل المبيد Paraquat المجهز بهيئة مركزات مستحلبة Emulsifiable concentrate (EC) من شركة Syngenta السويسرية، والحاوي على المادة الفعالة paraquat dichloride، بتركيز 200 غم/لتر. حضر محلول خزين منه بتركيز 0.1 وذلك بإضافة 1 مل من المبيد إلى 10 مل ماء مقطر معقم.

ثالثاً: المبيد Haloxyfop-p-Methyl

استعمل المبيد Haloxyfop-p-Methyl المجهز بهيئة مركزات مستحلبة (EC) من شركة Lizzagro الصينية والحاوي على المادة الفعالة Haloxyfop-p-Methyl بتركيز 10.8% (وزن/ حجم)، حضر محلول خزين منه بتركيز 0.01 وذلك بإضافة 1 مل من المبيد إلى 100 مل ماء مقطر معقم.

تحديد التركيز المثبط الأدنى Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

من أبسط الطرق المتبعة لقياس MIC في الفطر هي طريقة الوخز (Point inculation) وذلك بعمل عدد من الوخزات من السلالة A1 على وسط M الخالي من أي إضافة (عينة السيطرة)، وكذلك على وسط M+ تراكيز متصاعدة من المبيد قيد

الدراسة، ثم حضنت الأطباق لمدة 4 أيام بعدها جرى قياس متوسط أقطار المستعمرات النامية على وسط M+ المبيد ومقارنتها بمتوسط أقطار المستعمرات النامية على وسط M فقط، وحسبت النسبة المئوية للتثبيط كما يلي:

$$\text{النسبة المئوية للتثبيط} = \frac{(\text{متوسط اقطار المستعمرات على M}) - (\text{متوسط اقطار المستعمرات على M+المبيد})}{\text{متوسط اقطار المستعمرات على M}} \times 100$$

تحضير العالق الكونيدي

حُضر العالق الكونيدي من مرج كونيدي كثيف لمزارع فطرية فتية بعمر 3 أيام نامية على وسط CMTS، والعالق الكونيدي غير المخفف (التخفيف 10^0) يمكن استعماله لإجراء سلسلة من التخافيف العشرية (Dhahi, 1978; Caten, 1979).

عزل الطافرات وحساب تكرارها

في دراستنا استعملنا نظام البحث عن الطافرات المقاومة للعقار السام 8-Azaguanine (AZG) وبتركيز نهائي من العقار مقداره 25 مايكروغرام/مل من الوسط الزرعي إذ وجد أن هذا العقار يكون ساماً للفطر *A.amstelodami* في حدود التركيز 10 مايكروغرام/مل من الوسط (Dhahi, 1978 ; Caten, 1979).

إذ تم تلقيح أطباق من (MD+AZG) بالعالق الكونيدي 10^0 وبواقع 0.1 مل لكل طبق لحساب عدد الطافرات المقاومة وفي والوقت نفسه لقح العدد نفسه من أطباق MD بالعالق 10^{-4} وبواقع 0.1 مل لكل طبق لحساب العدد الحي، وقدّر حجم العشيرة المتوقعة (Expected population) كما يلي:

حجم العشيرة المتوقعة = عدد المستعمرات على أطباق MD× مقلوب التخفيف

أما حساب تكرار الطافرات المقاومة سواء التلقائية أو المستحثة فكما يلي:

$$\text{تكرار الطافرات} = \frac{\text{العدد الكلي للمستعمرات الطافرة}}{\text{حجم العشيرة المتوقعة}}$$

كررت العملية ثلاث مرات وحُسب متوسط تكرار الطافرات.

دراسة التأثير التطفيري للمبيدات

جرى اعتماد ثلاث طرائق لدراسة التأثير التطفيري للمبيدات قيد الدراسة وهي: طريقة المعاملة المسبقة، وطريقة التضمين بالطبق، وطريقة النمو الوسيط. (Brusick, 1980; Baburdi and Politi, 1989). إذ جرت دراسة ثلاثة تراكيز تحت سامة من كل مبيد بالاعتماد على نتائج تحديد التركيز المثبط الأدنى لكل مبيد. ففي طريقة المعاملة المسبقة (Pretreatment method) جرت معاملة العالق الكونيدي 10^0 بالتراكيز تحت السامة الثلاثة من كل مبيد لمدة ساعة بعدها نشر 0.1 مل من هذا العالق على كل طبق من أطباق (MD+AZG) وبعد التحضين حُسب تكرار الطافرات المقاومة للـ AZG التلقائية والمستحثة بالمبيد. أما في طريقة التضمين بالطبق (Plate incorporation) نُشر 0.1 مل من العالق 10^0 مباشرة على كل طبق من أطباق (MD+ AZG+ المبيد قيد الدراسة) وبعد التحضين حُسب تكرار الطافرات المقاومة للـ AZG التلقائية والمستحثة بالمبيد. أما في طريقة النمو الوسيط (Growth-mediated method) نُشر 0.1 من العالق 10^0 على أطباق M + المبيد، وكذلك على أطباق M لوحدها، وحضنت لمدة أربعة أيام، ولحساب تكرار الطافرات المقاومة للـ AZG والمستحثة بالمبيد نُشر 0.1 مل من العالق 10^0 المحضر من أطباق M+ المبيد على أطباق (MD+AZG) ولحساب تكرار الطافرات التلقائية المقاومة للـ AZG نُشر 0.1 مل من العالق 10^0 المحضر من أطباق M على أطباق (MD+AZG) وفي كل معاملة كانت تجري عملية تلقيح 0.1 مل من العالق 10^{-4} على كل طبق من أطباق MD لوحدها لحساب العدد الحي من الكونيدات. أما عينة السيطرة الموجبة فكان

عن طريق تعريض العالق الكونيدي 10^0 غير المعامل إلى أشعة UVC والتي تكون مطفرة للخلايا الحية وجرى التعريض كما جاء في (الجاف، 1990)، وأعتمد على نتيجة واحدة لعينة السيطرة الموجبة، وهذه فقط للتأكد من أن سلالة A1 قابلة للطفور عند تعريضها لمطفر معلوم وهو هنا أشعة UV.

التحليل الإحصائي

أجري التحليل الإحصائي للنتائج باستعمال الاختبار (t) لأربع درجات حرية $t_{(2+2)}$، إذ جرت مقارنة تكرار الطافرات المقاومة للـ AZG المستحثة بالمبيد مع متوسط تكرار الطافرات المقاومة للـ AZG التلقائية، ومقارنة قيم $t_{(2+2)}$ مع قيمتها الجدولية للعدد نفسه من درجات الحرية لملاحظة مدى معنوية الفرق بينها (Steel and Torrie, 1980).

النتائج والمناقشة

يبين الجدول (1) النسبة المئوية لتثبيط نمو السلالة A1 من الفطر بفعل مبيد الأدغال Glyphosate إذ تراوحت نسبة التثبيط بين 16% للتركيز (1920 µg/ml) و 100% للتركيز (14400 µg/ml).

الجدول 1: قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على وسط M الحاوي على تراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Glyphosate

تركيز المبيد Glyphosate µg/ml	متوسط القطر (سم)	النسبة المئوية للتثبيط
0.0	1.86	0
1920	1.56	16
2880	1.36	27
3840	0.9	52
4800	0.73	62
9600	0.53	71
14400	0	100

فيما يبين الجدول (2) النسبة المئوية لتثبيط السلالة A1 من الفطر بفعل مبيد الأدغال Paraquat والتي تراوحت بين 13% للتركيز (200 µg/ml) و 100% للتركيز (2200 µg/ml).

الجدول 2: قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على وسط M الحاوي على تراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Paraquat

تركيز المبيد Paraquat µg/ml	متوسط القطر (سم)	النسبة المئوية للتثبيط
0.0	1.76	0
200	1.53	13
280	1.2	32
400	1.03	41
700	0.76	57
1200	0.7	60

2000	0.13	93
2200	0	100

ويبين الجدول (3) النسبة المئوية لتثبيط نمو السلالة A1 من الفطر بفعل المبيد Haloxyfop-p-methyl والتي تراوحت بين 21% للتركيز (2.16 µg/ml) و 100% للتركيز (200 µg/ml).

الجدول 3: قطر المستعمرات (سم) للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* النامية على وسط M الحاوي على تراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Haloxyfop-p-methyl

تركيز المبيد Haloxyfop-p-methyl µg/ml	متوسط القطر (سم)	النسبة المئوية للتثبيط
0.0	1.87	0
2.16	1.48	21
4.32	1.4	25
10.8	1.27	32
21.6	0.78	58
43.2	0.73	61
108	0.55	70
200	0	100

القدرة التطفيرية للمبيدات بطريقة المعاملة المسبقة Pretreatment method

يبين الجدول (4) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي، وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة بالنسبة للمبيد Glyphosate.

الجدول 4: المقارنة الإحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Glyphosate بطريقة المعاملة المسبقة مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Glyphosate µg/ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.36±1.06	–
2880	0.44±1.77	1.19
3840	0.36±1.54	0.94
4800	0.37±1.63	1.1
UVC	10.60±51.23	–

وعند إجراء التحليل الإحصائي بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية عند مستوى احتمالية 0.5% تبين عدم وجود فروق معنوية. إذ إن قيمة $t_{(4)}$ الجدولية أكبر من قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة للتراكيز الثلاث من المبيد، والشيء نفسه يقال بعدم وجود تأثير تطفيري بهذه الطريقة من المعاملة للمبيدين Paraquat (الجدول 5) و Haloxyfop-p-methyl (الجدول6)، إذ كانت قيم $t_{(4)}$ المحسوبة كلها غير معنوية.

الجدول 5: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Paraquat بطريقة المعاملة المسبقة مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Paraquat µg/ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.20±1.56	-
200	0.31±2.13	1.54
280	0.45±2.11	1.12
400	1.06±2.65	1.01
UVC	10.60±51.23	-

الجدول 6: المقارنة الإحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Haloxyfop-p-methyl بطريقة المعاملة المسبقة مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Haloxyfop-p-methyl µg/ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.28±0.78	-
4.32	0.32±1.12	0.79
10.8	0.43±1.33	1.08
21.6	0.22±1.43	1.81
UVC	10.60±51.23	-

القدرة التطفيرية للمبيدات بطريقة التضمين بالطبق Plate incorporation method

بالنسبة للمبيد Glyphosate يبين الجدول (7) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي، وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 7: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Glyphosate بطريقة التضمين بالطبق مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Glyphosate µg/ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.36±1.06	-

2880	0.25±0.98	0.18
3840	0.27±0.89	0.38
4800	0.20±0.85	0.51
UVC	10.60±51.23	–

وعند إجراء التحليل الإحصائي للنتائج بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية البالغة (2.78) عند مستوى احتمالية 5% لوحظ عدم وجود فروق معنوية إذ إن قيمة $t_{(4)}$ الجدولية أكبر من قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة للتراكيز الثلاث من المبيد.

أما بالنسبة للمبيد Paraquat فيبين الجدول (8) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 8: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 للفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Paraquat بطريقة التضمين بالطبق مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Paraquat µg/ ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.20±1.56	–
200	0.12±1.19	1.61
280	0.17±1.03	2.04
400	0.08±0.71	3.86*
UVC	10.60±51.23	–

- تختلف معنوياً عن المعاملة صفر (بدون مبيد).

وعند إجراء التحليل الإحصائي بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية البالغة (2.78) عند مستوى احتمالية 5% لوحظ عدم وجود فروق معنوية للتركيزين (200 و 280 مايكروغرام/ مل) إذ إن قيمة $t_{(4)}$ الجدولية أكبر من قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة، أما التركيز الأخير وهو 400 مايكروغرام/ مل فكان هناك فرق معنوي إذ كانت قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة (3.86) أكبر من قيمة $t_{(4)}$ الجدولية. غير ان اتجاه تأثير المبيد هو نحو خفض تكرار الطافرات وليس زيادتها، من 1.56×10^{-6} من المعاملة صفر إلى 0.71×10^{-6} وهذه مشاهدة تسترعي الاهتمام.

أما بالنسبة للمبيد Haloxyfop-p-methy فيبين الجدول (9) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي، وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 9: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 للفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Haloxyfop-p-methyl بطريقة التضمين بالطبق مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Haloxyfop-p-methyl µg/ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.28±0.78	–
4.32	0.25±0.68	0.26

10.8	0.22±0.68	0.27
21.6	0.16±0.50	2.8
UVC	10.60±51.23	–

وعند إجراء التحليل الإحصائي للنتائج بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية البالغة (2.78) عند مستوى احتمالية 5% لوحظ عدم وجود فروق معنوية للتركيزين (4.32 و 10.8 مايكروغرام/مل) حيث كانت قيمة $t_{(4)}$ الجدولية أكبر من قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة. أما التركيز الأخير (21.6 مايكروغرام/مل) فكان هناك فرق معنوي إذ كانت قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة (2.8) أكبر من قيمة $t_{(4)}$ الجدولية غير أن هذا فرقاً طفيفاً جداً ولا يمكن عدّه دليلاً على أن هذا المبيد ذو تأثير تطفيري.

القدرة التطفيرية للمبيدات بطريقة النمو الوسيط Growth-mediated method

بالنسبة للمبيد Glyphosate يبين الجدول (10) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي، وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 10: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Glyphosate بطريقة النمو الوسيط مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Glyphosate µg/ ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10-6 x	قيمة t(4) المحسوبة
0	0.36±1.06	–
2880	0.86±1.90	0.91
3840	0.89±1.95	0.93
4800	1.24±2.60	0.81
UVC	10.60±51.23	–

وعند إجراء التحليل الإحصائي بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية البالغة (2.78) عند مستوى احتمالية 5% تبين عدم وجود فروق معنوية إذ إن قيمة $t_{(4)}$ الجدولية أكبر من قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة للتراكيز الثلاث من المبيد، والشي نفسه يقال عن التأثير التطفيري للمبيد Paraquat باتباع هذه الطريقة إذ لا فروق معنوية من تكرار الطافرات بين الكونيدات المعاملة وغير المعالمة (جدول 11).

أما بالنسبة للمبيد Paraquat فيبين الجدول (11) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 11: المقارنة الاحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Paraquat بطريقة النمو الوسيط مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Paraquat µg/ ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.20±1.56	–

200	0.32±2.52	2.53
280	0.36±1.5	0.15
400	0.53±2.43	1.53
UVC	10.60±51.23	–

أما بالنسبة للمبيد Haloxyfop-p-methy فيبين الجدول (12) تكرار الطافرات ومتوسطاتها مضافاً إليها أو مطروحاً منها الخطأ القياسي، وقيم $t_{(4)}$ المحسوبة.

الجدول 12: المقارنة الإحصائية باستخدام اختبار *t* لتكرار الطافرات (10^{-6}x) المقاومة للعقار 8-azaguanine بين كونيدات السلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* المعرضة لتراكيز مختلفة من مبيد الأدغال Haloxyfop-p-methyl بطريقة النمو الوسيط مقارنة بمثيلاتها غير المعاملة وتلك المعاملة بأشعة UVC

تركيز المبيد Haloxyfop-p-methyl µg/ ml	(المتوسط ±الخطأ القياسي) 10^{-6} x	قيمة $t_{(4)}$ المحسوبة
0	0.28±0.78	–
4.32	0.27±2.33	3.97*
10.8	0.26±2.85	5.45*
21.6	0.37±3.50	5.93*
UVC	10.60±51.23	–

- وجود فرق معنوي بين تكرار المعاملة وتكرار السيطرة السالبة (صفر).

وعند إجراء التحليل الإحصائي للنتائج بمقارنة قيم $t_{(4)}$ المحسوبة مع قيمة $t_{(4)}$ الجدولية البالغة (2.78) عند مستوى احتمالية 5% لوحظ وجود فرق معنوي كبير عند جميع التراكيز الثلاثة المختبرة، إذ إن قيم $t_{(4)}$ المحسوبة أكبر من قيمة $t_{(4)}$ الجدولية.

ومن نتائج التطفير السابقة يتبين أن المبيد Glyphosate غير مطفر للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* وبالطرق الثلاث للتطفير المعتمدة في هذه الدراسة وبكافة التراكيز المستخدمة من المبيد، وتتفق هذه النتائج مع نتائج العديد من الباحثين حول دور هذا المبيد في إحداث الطفور باستعمال أنظمة مختبرية مختلفة، إذ تشير نتائج تجارب الباحثين (Li and Long, 1988; Kier *et al.*,1997) إلى عدم حدوث الطفور بفعل هذا المبيد في اختبار الطفرة الراجعة في بكتريا السالمونيلا (اختبار Ames) بوجود أو عدم وجود التنشيط الأيضي وكذلك غير مطفر في خلايا مبيض Chinese hamster بوجود أو عدم وجود التنشيط الأيضي (Li and Long, 1988)، وقد أعطى هذا المبيد نتائج سالبة أيضاً في اختبار الطفرة المتنحية المرتبطة بالجنس في ذبابة الفاكهة (Gopalan and Njagi, 1981).

اما بالنسبة للمبيد Paraquat فإن نتائج التطفير السابقة أظهرت بأن هذا المبيد غير مطفر للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* بطريقة المعاملة المسبقة والنمو الوسيط وبكافة التراكيز المستخدمة من المبيد، أما في طريقة التضمين بالطبق فوجد أن التركيزين (200, 280 µg/ml) غير مطفرين. أما عند التركيز (400 µg/ml) فكان هناك فرق معنوي بين تكرار الطافرات بوجود المبيد وعدم وجوده، إلاّ أن هذا الفرق يتجه نحو خفض تكرار الطافرات وليس زيادتها (الجدول 12). غير ان هذه المشاهدة مشاهدة فردية ولابد من تكرارها للتأكد منها وذلك لأن البحوث الأخرى تشير إلى أن هذا المبيد يزيد من التأثيرات الوراثية لا خفضها.

إذ تشير نتائج الباحث Salam وجماعته (1993) إلى الإمكانية التطفيرية لهذا المبيد باستخدام خمسة أنظمة مختبرية مختلفة وهي *Allium cepa* و *Vicia faba* والخميرة، وذبابة الفاكهة والخلايا اللمفاوية للإنسان بأن للمبيد نشاط تطفيري على المستوى الخلوي في *Allium cepa* و *Vicia faba* والخلايا اللمفاوية للإنسان ويسبب التشوهات الكروموسومية (CAs).

أما التقارير المقدمة من قبل FAO (2008) فقد استنتجت أن PQ مطفر في الخلايا اللمفاوية للإنسان، وفي خلايا Chinese hamster ولكنه غير مطفر في خلايا كبد الجرذان والخلايا اللمفاوية للفئران.

وفي دراسة للباحث Speit وجماعته (1998) للكشف عن الفعالية السامة جينياً لهذا المبيد على الخلايا V79 في Chinese hamster باستخدام اختبار Comet و CAs استنتجوا بأنه من غير الممكن التحري عن أضرار الأكسدة في قواعد DNA بعد المعاملة بالمبيد وبذلك دلّلوا بأن المبيد حفز التشوهات الكروموسومية (CAs) ولكنه لا يحفز أضراراً في DNA، إذ لم يؤدِ إلى حدوث طفرة في جين HPRT في مزارع خلايا Chinese hamster V79.

وربما جميع هذه النتائج تتفق مع التقرير المقدم من قبل Haley (1979) والذي يقول فيه بأن المبيد Paraquat يكون مطفراً أو غير مطفرٍ اعتماداً على ظروف التجربة.

أما بالنسبة للمبيد Haloxyfop-p-methyl فأظهرت نتائج التطفير السابقة بأنه غير مطفرٍ للسلالة A1 من الفطر *A.amstelodami* بطريقتي المعاملة المسبقة والتضمين بالطبق المعتمدة في هذه الدراسة وبكافة التراكيز المستخدمة من المبيد، وتتفق هذه النتائج مع نتائج العديد من الباحثين بأن هذا المبيد غير سام جينياً أو مطفرٍ في اختبار الطفرة المرتدة في بكتريا *Salmonella* بوجود أو عدم وجود التنشيط الأيضي وكذلك ليس له تأثير خلوي سام في خلايا اللبائن (Marrs, 2004; EFSA, 2009)، ويعود السبب أن هذا المبيد يتداخل مع acetate في الأحماض الامينية وليس له تأثير أو تداخل مع الأحماض النووية أو البروتينات (Stoltenbery, 1988; Hoppe, 1989)، ولكنه أعطى تأثيراً تطفيرياً موجباً في طريقة النمو الوسيط وبكافة التراكيز المستخدمة من المبيد وهذا ربما يدل على ان المبيد تأيض داخل خلايا الفطر أثناء نمو الغزل الفطري وانقسام الأنوية على وسط النمو الخالي من المادة الانتقائية AZG والحاوي على المبيد، وحصل تنشيط للمبيد بفعل انزيمات النمو الخضري والذي كان له دور في زيادة أثره التطفيري على كونيدات الفطر وبذلك ازدادت نسبة تكرار الطافرات وازدادت معنوية الفرق أو قد يتحول المبيد إلى مركبات وسطية أو نواتج نهائية جديدة قد تكون مطفرة.

من كل ما تقدم ومن النتائج المتضاربة للتأثيرات الوراثية لهذه المبيدات في البحث الحالي وكذلك من تقارير الباحثين الآخرين نوصي بالمزيد من التقصي عن التأثير الوراثي بأشكاله المختلفة وليس الطفرة النقطية فقط وكذلك ربما باستخدام أنظمة تجريبية أخرى اكثر حساسية أو ملائمة وذلك لأهمية هذه المبيدات وانتشار استعمالاتها في الميدان الزراعي.

المصادر العربية

الجاف، بهروز محمود (1990). دراسة وراثية لمقاومة بعض مضادات المايتوز في الفطر *Aspergillus amstelodami*، دراسة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Baburdi, N.; Politi, M.G. (1989). Different action of MMS and EMS in UV sensitive strain of *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.*, **217**, 211-217.

Banaee, M.; Davoodi, M.H.; Zoheiri, F. (2013). Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). *J. Open Veterinary*, **3**, 36-42.

Banas, W.; Furmanek, T.; Banas, A. (2012). Effect of haloxyfop and cerulenin on de novo biosynthesis of lipids in roots of wheat and Maize. *ACTA Biochemical Polonica.*, **59**, 567-573.

Brusick, D. (1980). "Principles of Genetic Toxicology". Plenum Press, New York.

Brusick, D. (1982). Valu Short-term mutagenicity in human population montoring. In: K.C. Bora ;

G.R., Doughlas and F.R. Nestmann (eds.). *Chemical Mutagenesis Progress*. Eisvers biomedlial. Oxford.

Caten, C.E. (1979). Genetical determination of conidial colour in *Aspergillus heterocaryoticus* and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami*. *Trans. Brit. Myco. Soci.,* **73**, 47-65.

Dhahi, S.J. (1978). Genetic studies in *Aspergillus amstelodami*. Ph.D. Thesis, University of Birmingham, England.

EFSA. (2009). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance haloxyfop-p- (haloxyfop-R). *EFSA. J.,* **7**, 1348.

FAO. (2008). FAO Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides. Paraquat dichloride 1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride. Food and Agriculture Organization of the UnitedNations,Rome.http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/Specs/docs/Pdf/new/paraquat08.pdf.

Gopalan, H.N.B.; Njagi, G.D.E. (1981). Mutagenicity testing of pesticides: 111 *Drosophila*: Recessive sex-linked lethals. *Genetics,* **97**, 44.

Haley, T.J. (1979). Review of the toxicology of paraquat (1,l'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride). *Clin. Toxicol.,* **14**, 1-46.

He, X.; Wang, L.; Szklarz, G.; Bi, Y.; Ma, Q. (2012). Resveratrol inhibits paraquat-induced oxidative stress and fibrogenic response by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics,* **342**, 81-90.

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

Hoppe, H.H. (1989). Fatty acid biosynthesis a target site of herbicide action: In P. Boger and G. Sandmann. (eds.). *Targes site of herbicide action*. CRC Press, Inc. Boca Raton.

Kafer, E.; Scott, B.R.; Kappas, A. (1986). Systems and results of tests for chemical induction of mitotic malsegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.,* **167**, 9-34.

Kier, L.D.; Stegeman, S.D.; Dudek, S.; McAdams, J.G.; Flowers, F.J.; Huffman, M.B.; Heydens, W.F. (1997). Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor formulations. *Fundam. Appl. Toxicol.,* **36**, 305.

Kortekamp, A. (2011). "Herbicide and Environment". InTech, Croatia.

Li, A.P.; Long, T.J. (1988). An evaluation of genotoxic potential of glyphosate. *Fundam. Appl. Toxicol*. **10**, 537-546.

Marrs, T.C. (2004). "Toxicology of Herbicides". In: T.C. Marrs and B. Ballantyne (eds.). Pesticide Toxycology and International Regulation. John Wiley and Sons. Ltd.

Moreno, N.C.; Sofia, S.H.; Martinez, C.B. (2013). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish prochilodus lineatus. *Environ. Toxicol. Pharmacol.,* **37,** 448-454.

Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A. (2005). "Microbiology". 6th ed., McGraw-Hill, New York. to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. *Environ. Mol. Mut.,* **50**, 800-807.

Salam, A.Z.; Hussein, E.H.A.; Anwar, H.A.; Mansour, S.A. (1993). The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. *Mutat. Res.,* **319**, 89-101.

Speit, G.; Haupter, S.; Hartmann, A. (1998). Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.,* **412**, 187-193.

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

Stoltenbery, D.E. (1988). Selectivity and mechanism of action of Sethoxydium and Haloxyfop. Ph.D. Thesis. Univ. Minnesota.

Zabaloy, M.C.; Zanini, G.P.; Bianchinotti, V.; Gomez, M.A.; Garland, J.L. (2011). Herbicides in the soil environment: Linkage between bioavailability and microbial ecology. In: S. Soloneski and M.L. Larramendy (eds.). *Herbicides, Theory and Applications*. InTech Argentina.