------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 9، خاص بعلوم الحياة, ص179-196، 2006 ------

التأثير التطفيري للترايسورالين والأشعة فوق البنفسجية القـريبة فـي الفطر اسبرجلس امستيلودامي

ساهي جواد ضاحي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

رافعة قادر جرجيس
قسم علوم الحياة
كلية التربية
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/3/29 ؛ تاريخ القبول 2005/5/16)

الملخص

جرى اختبار القدرة التطـفيرية للعقـار ترايـسورالين 4,5,8-Trimethylpsoralen (TMP) فـي كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami* وأجري اختبار لخمسة تراكيز غير مثبطة للنمـو (0، 1.6، 3.2، 4.8 و 6.4 مايكروغرام/مل) وذلك بتعريض الكونيدات المعاملة بالعقار ولفترات زمنية مختلفة (0، 10، 20، 30 و 40 دقيقة) من الأشعة فوق البنفسجية القريبة (UVA، 365 نانوميتر). وقـد جـرت معاملـة الكونيدات بالعقار بطريقة التضمين في الطبق، إذ تزرع الكونيدات على الوسط الحاوي للعقار فضلاً عن المادة الانتقائية 8-azaguanine التي تعزل الأفراد الطافرة المقاومة، ومن ثم تعرض الأطباق للأشعة. ولم يستطيع عقار الترايسورالين بمفرده أو أشعة UVA بمفردها أن تحث معدلات تطفيريـة تفـوق معنويـاً المعدلات التلقائية في هذا الفطر في الظروف التجريبية الحالية ولكن جميع المعاملات المتضمنة التراكيز المختلفة من العقار والفترات المختلفة من التشعيع قد أنتجت مـعدلات أعلى إحـصائياً مـن المعـدلات التلقائية. وقد أجري اختبار التأثير التطفيري للعقار 8-methoxypsoralen (8-MOP) في كونيدات الفطر *A. amstelodami* وأستخدم كسيطرة ايجابية لكونه مطفراً معروفاً في الفطريات وأجري الاختبار بطريقة التضمين في الطبق وبنفس التراكيز التي استخدمت في حالة العقار ترايسورالين وقد أعطى نتائج ايجابية فـي كـونيدات الـفطر *A. amstelodami*، أما معاملة الكونيدات بالكحول الاثيلي المطلق والذي استخدم كمذيباً للعقار فلم يحث سواء بمفرده ام بتفاعله مع فترات الإشعاع المختلفة، معدلات تطفيرية تختلف عن المعدل التلقائي في هذا الفطر.

Mutagenicity of Trisoralen (TMP) and NUV in *Aspergillus amstelodami*

Sahi J. Dhahi
Department of Biology
College of Science
Mosul University

Rafia K. Girges
Department of Biology
College of Education
Mosul University

ABSTRACT

The combined mutagenic action of five subinhibitory concentrations (0, 1.6,3.2, 4.8 and 6.4 μg/ml) of trisoralen (4,5,8-Trimethylpsoralen, TMP) and five exposur times (0, 10, 20, 30 and 40 min) to the long wave (UVA, 365 nm) light was tested in conidia of the fungus *Aspergillus amstelodami*. The drug was incorporated together with the selective agent (8-azaguanine) into the growth plates. The plates were inoculated with conidia, left for an hour and then exposed to UVA and incubated for the growth of the resistant mutants. Neither trisoralen by itself nor UVA alone appeard mutagenic under our experimental conditions. Combinations of the drug and UVA, however, all produced mutant frequencies significantly higher than the spontaneous one. 8-MOP used as a positive control and it induces frequency of mutation about 87.5 times that of the spontaneous one by plate incorporation method. The solvent, ethanol by itself or in combination with UVA, induced no mutant frequency greater than the spontaneous one.

المقدمة

لقيت مركبات السورالين اهتماماً كبيراً بسبب استخداماتها في المعالجات الكيموضوئية (Photochemotherapy treatments) لبعض الأمراض المزمنة مثل الصدفية (Psoriasis) والبهاق (Vitiligo) وورم النسيج اللمفي نوع Cutaneus Tcell Lymphoma (Eileen et al., 2002) والسورالينات لكي تحدث تأثيراً فعالاً في المعالجة، يجب أن تنشط ضوئياً بواسطة الأشعة فوق البنفسجية القريبة- UVA (320-400 نانوميتر) (Rousset et al., 1997). وتعد جزيئة الـ DNA الهدف الرئيسي للتفاعلات الضوئية للسورالينات. اذ تمتلك جزيئة السورالين المستقيمة طرفين للتفاعل مع جزيئة الـ DNA ولذلك تسمى ثنائية الفعالية (Bifunctional). ويتم التفاعل بين جزيئة السورالين وألـ DNA على خطوتين، في الأولى والتي تحصل في الظلام، تندس جزيئة السورالين المستقيمة بين القواعد النيتروجينية للـ DNA وترتبط بأواصر غير تساهمية ضعيفة مع قواعد البريميدين وبشكل رئيسي الثايمين مكونةً المعقد Noncovalent DNA-Psoralen complex (Hearst et al., 1984). وبعد التعرض للأشعة فوق البنفسجية (UVA) فإن أحد طرفي جزيئة السورالين (3,4-Pyrone او 4,5-Furane) سوف ينشط ضوئياً ويرتبط مع الأصرة المزدوجة 5=6 للثايمين (Duval-Valentin et al.,1998) وبذلك يتكون مايعرف بالإضافات الأحادية (Monoadducts-MAS)

مع جزيئة الـ DNA. ومع استمرار التشعيع فإن الإضافات الأحادية للفيوران (4,5- Furan side monoadducts) سوف ترتبط بجزيئة ثايمين أخرى في السلسلة المقابلة للـ DNA وينتج عن ذلك تكوين الجسور الرابطة بين سلسلتين الـ Interstrand cross-Links-ICL) DNA) أو مايعرف بالإضافة الثنائية (Biadducts) (Ahmad and Gerd,2004; Papadopoulo et al.,1988) .

وقد بينت الدراسات التي اجريت على البكتريا والخلايا الحقيقية النواة أن كلاً من الإضافات الأحادية والإضافات الثنائية للسورالينات تؤدي الى حدوث الطفرة في الـ DNA الحامل لها ويكون التأثير التطفيري للإضافات الثنائية يكون اكبر حجماً من الإضافات الأحادية (Bredberg and Nachmansson,1987) وعلى الرغم من النتائج الإيجابية التي أظهرتها المعالجة بالسورالينات ولاسيما الترايسورالين (TMP) والميثوكسي سورالين (8-MOP) الا انة ظهرت تأثيرات ضارة على بعض المرضى، ومنها ما كان قريب المدى، مثل التسمم الضوئي للجلد (Skin phototoxicity) وتغيرات في الجهاز المناعي، وبعضها ظهر على المدى البعيد مثل سرطان الجلد (Skin cancer) (Bordin et al., 1991).

وتبين من الدراسات التي اجريت على الحيوانات المختبرية والخلايا المزروعة أن التسمم الوراثي (Genotoxic) بالسورالين والاشعة فوق البنفسجية (UVA) يتضمن كل من التطفير (Mutagenesis) والاتحادات (Recombinogenesis) والتشوهات الكروموسومية (Clastogenesis) والتسرطن (Carcinogenesis) (Song and Tapley, 1979). أن كفاءة السورالينات في المعالجات الكيموضوئية هو نتيجة التأثير المباشر في منع تضاعف الـ DNA في خلايا البشرة بسبب تكوين كل من الإضافات الأحادية والثنائية (الجسور الرابطة) والتي تقلل من كفاءة الـ DNA لكي يسلك كقالباً (Template) في عملية تضاعف واستنساخ الـ Cohen et al., 1980) DNA).

يهدف البحث الى امكانية الحصول على طفرات مقاومة للمادة السامة (8-azaguanine) ومستحثة بفعل العقار ترايسورالين (TMP) وبوجود الأشعة فوق البنفسجية القريبة (UVA) في الفطر اسبرجلس امستيلودامي *A. amstelodami* ومقارنة ذلك بالتأثير التطفيري للعقار ميثوكسي سورالين (8-MOP) بوصفه مطفراً معروفاً واتخاذه سيطرة ايجابية (Positive control)، وكذلك يوازن التأثير التطفيري للترايسورالين بمعدل الطفور التلقائي بوصفه سيطرة سالبة (Negative control) وقد استخدم نظام الفطر اسبرجلس لأن هذا الفطر يمتلك امكانية واسعة للدراسات الوراثية ومنها دراسة التطفير الكيميائي (شناوه، 1996).

المواد وطرائق العمل

1- كائن الأختبار:

أجريت جميع التجارب باستخدام السلالة $A_1(wA_1)$ من الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami*، وهي سلالة برية بالنسبة لجميع الاحتياجات الغذائية لكنها تحمل الطفرة التلقائية wA_1 التي حولت اللون الأخضر البري لكونيدات هذا الفطر الى اللون الأبيض وقد تم الحصول عليها من الدكتور C.E.Caten من قسم الوراثة، جامعة برمنكهام في انكلترا.

2- الأوساط الزرعية وظروف الزرع:

أن ظروف الزرع والأوساط الزرعية هي كما وصفها Caten (1979) وقد استخدم وسطان أساسيان لأغراض النمو وهما: الوسط الأدنى غير المضعد (Minimal medium) ويرمز له (M). ووسط مستخلص الشعير-ملح الطعام (Maltextract- Salt medium) ويرمز لهُ (MTS). ومكونات الأوساط الغذائية ومحلول الإضافة الكاملة هي كما مبينة في (جرجيس، 1984). ويثبت الرقم الهيدروجيني للأوساط الزراعية بعد التحضين بحدود 6. ويتم تحضين المزارع الفطرية بدرجة 30ْم. أما مدة التحضين فكانت ستة أيام لدراسة التأثير التطفيري وأربعة أيام للحصول على الكونيدات لتحضير العالق الكونيدي لأجراء الاختبارات المختلفة.

3- المحاليل الخزينة للكيميائيات:

3-1 المحلول الخزين للميثوكسي سورالين (8-MOP)

تم تحضير محلول خزين منهُ باستخدام الكحول الأثيلي المطلق لأذابته وتم تحضير محلول خزين منهُ بتركيز مقدارهُ 800 مايكروغرام/مل وذلك باذابة 40 ملغم من العقار في 50 مل من الكحول المطلق. وتحفظ القنينة بعيداً عن الضوء وبدرجة 5ْم لحين الاستعمال.

3-2 المحلول الخزين للترايسورالين (TMP)

تم الحصول على محلول خزين من العقار بتركيز 800 مايكروغرام/مل من الكحول الاثيلي المطلق ويحفظ المحلول بعيداً عن الضوء بدرجة 5ْم.

3-3 خزين الازاكوانين (8-AZG)

العقار 8-azaguanine هو نظير القاعدة النيتروجينية الطبيعية Guanine ولكنهُ سام للفطر اسبرجلس امستيلودامي وبتراكيز قليلة في حدود 10 مايكروغرام/مل (الحمداني، 1985) وقد جرى تحضير خزين لهذا المركب بتركيز نهائي قدرهُ 5000 مايكروغرام/مل وكما مبين في (شناوه، 1996). وتم استخدامهُ بتركيز نهائي في وسط النمو قدرهُ (50 مايكروغرام/مل من وسط النمو) وذلك للتحري عن الطفرات المقاومة لهذا العقار التلقائية والمستحثة.

4- مصدر الإشعاع:

استخدم مصباح UV المجهز من شركة Gallenkamp وبالرقم LH-335 والذي يعطي معظم أشعته عند الطول الموجي 365 نانوميتر.

5- تحضير العالق الكونيدي:

جرى تحضير العالق الكونيدي من مزرعة حديثة النمو بعمر أربعة أيام مزروعة على الوسط CMTSوهذه المزرعة أخذت من مستعمرة واحدة نامية على الوسط CMD وقد جرى تقدير عدد الكونيدات فيه باستخدام شريحة عد خلايا (Heamacytometer) وظهر انها بحدود 10^7 كونيدة/مل. وقد استخدم هذا العالق لعزل الطافرات التلقائية والمستحثة المقاومة للعقار 8-AZG وكذلك لحساب العدد الحي بعد أن تحضر من العالق تخافيف متسلسلة لتعطي عدداً مناسباً من المستعمرات بحيث يمكن عدها بدقة.

6- حساب العدد الحي للكونيدات في العالق الكونيدي:

بما أنه ليس جميع الكونيدات التي يولدها الفطر لها القابلية على الإنبات وتكوين المستعمرات ولذلك فان حساب تكرار حدوث الطافرات يجرى على اساس عدد الكونيدات الحية في العالق وليس على اساس العدد الكلي للكونيدات المعاملة. ولأجل ذلك تم تحضير تخافيف متسلسلة من العالق الكونيدي غير المخفف 10^0 ولغاية 10^{-5}. ثم يتم تلقيح طبقين MD بـ 0.1 مل لكل طبق من العالق ذي التخفيف 10^{-5} وتحضن الأطباق بدرجة 30م ثم يحسب عدد المستعمرات النامية على الطبقين ويؤخذ المعدل لحساب عدد الكونيدات الحية في 1مل من العالق الكونيدي غير المخفف أي ذي التركيز (10^0) من خلال المعادلة التالية:

المعدل × 10 × 10^5 (مقلوب التخفيف)= عدد الكونيدات الحية

7- تحديد التركيز الأدنى من العقار المثبط للنمو (MIC):

جرى تحديد التركيز الأدنى المثبط للنمو لكل من الترايسورالين والميثوكسي سورالين والكحول الاثيلي المطلق على الوسط MD الحاوي على تراكيز متصاعدة من المادة الكيميائية ابتداءاً من الصفر، وقد جرى الاختبار بطريقة الوخز (Point inoculation) وذلك بعمل أربع طعنات في كل طبق MD مضافاً إليه العقار المدروس ثم تحضن الاطباق لمدة خمسة أيام عند درجة 30م ثم يتم قياس قطر المستعمرات الأربعة النامية في كل طبق وتقارن بقطر المستعمرات النامية على الوسط MD الخالي من العقار، ويلاحظ تركيز العقار الذي يتوقف عندهُ نمو الفطر حول نقطة الوخز اذ يمثل هذا التركيز الحد الأدنى من العقار المثبط لنمو الفطر.

8- دراسة التأثير التطفيري:

من المعروف انهُ لا السورالينات لوحدها ولا الأشعة UVA لوحدها قادرة علـــى احـــداث الطفـــرة (Alderson and Scott, 1970) ولكن استخدام هذان العاملان سويةً يؤدي الى زيادة ملحـــوظة في تكرار الأفـــراد الطافرة (Mutants) ضمن الأفراد الناجية من المعاملة. وقد جـــرى دراســـة أربعـــة تراكيـــز متصاعدة (1.6، 3.2، 4.8 و 6.4 مايكروغرام/مل) لكل من العقارين ترايسورالين والميثوكسي سورالين، فضلاً عن المعاملة الخالية من العقار أي المعاملة صفر، علماً بان جميع هذه التراكيز الأربعة هي تراكيز اقل من التركيز الأدنى المثبط لنمو الفطر لكلا العقارين. وقد جرى اختبار التأثير التطفيري للـــسورالينات بطريقة التضمين في الطبق وبواقع ثلاث مكررات لكل تجربة لأغراض التحليل الإحصائي.

9- طريقة التضمين في الطبق:

وتعد هذه الطريقة مفيدة في الكشف عن الكيميائيات المستقرة أي تلك التي لاتعاني تأيضاً (تحللاً أو تحورا) في النواة المنقسمة (Scott and Kafer, 1982) اذ أن المادة الكيميائية ستكون موجودة في الوسط وبامكان السبور أو الأنبوب الجرثومي أو الغزل الفطري أن يأخـــذها أثناء نموه عـــلى الوسط. وقد جرت عملية نشر كونيدات الفطر *A. amstelodami* على الـــوسط الغـــذائي MD الحـــاوي علـــى التراكيـــز المختـــلفة من العـــقار والمادة الأنتـــقائية 8-Azguanine وتترك لمدة ساعة في ظروف المختبـــر قبـــل تعريضها للإشعاع. ثم تجرى عملية التشعيع في الغرفة المظلمة ولخمس فترات زمنية (0، 10، 20، 30 و 40 دقيقة) وتترك الأطباق في الظلام لمدة لاتقل عن ساعة بعد التشعيع تحاشياً لحدوث الأصلاح الضوئي (Photoreactivation) ثم تحضن الأطباق لمدة ستة أيام بعدها يتم تقدير متوسط تكرار الطافرات المقاومة المستحثة لكل معاملة وكما مبين في (شناوه، 1996).

10- عينات السيطرة:

تضمنت الدراسة ثلاثة انواع من السيطراة وهي السيطرة السالبة ويمثلها العالق الكونيدي المحـــضر بالماء المقطر دون اضافة العقاقير ولا التعريض للإشعة UVA، والطفرات المتحصلة من هذه المعاملـــة تمثل الطفرات التلقائية المـــوجبة وتتمثل بالعقار الـــميثوكسي ســـورالين المعروف بقدرته التطفيرية في كونيدات الفطر اسبرجلس بـــوجود الأشعـــة فـــوق البنفسجية الطـــويلة الموجة (Alderson and Scott, 1970)، أما عينة المقارنة الثالثة فتضمنت معاملة الكونيدات بالكحول الاثيلـــي (بـــدلاً مـــن الـــسورالين) والأشعة فوق البنفسجية UVA، والغاية منها أبعاد الشك من احتمال كون المـــذيب العـــضوي (الكحـــول الاثيلي) نفسهُ مطفراً.

11- التحليل الإحصائي:

اجري التحليل الإحصائي باستخدام التصميم العشوائي الكامل (Complete Randumized Desing). وعند ظهور فروق معنوية بين المعاملات فقد اجري اختبار دنكن المتعدد الحدود للمقارنة بين متوسطات المعاملات عند مستوى احتمال 5% وفق الطريقة التي اوضحها الراوي وعبد العزيز، 1980.

النتائج والمناقشة

1- التراكيز الدنيا من السورالينات المثبطة لنمو الفطر

يتبين من الجدول (1) أن متوسط اقطار مستعمرات الفطر *A. amstelodami* تأخذ بالتناقص التدريجي مع زيادة تركيز العقار في وسط النمو وعند التركيز 56 مايكروغرام/مل من الوسط M يتوقف النمو تماماً حول نقطة الوخز وهذا يعني أن هذا التركيز هو التركيز الأدنى من الترايسورالين المثبط تثبيطاً تاماً لنمو الفطر. وبناءاً عليه تم اختيار أربعة تراكيز للعقار ترايسورالين غير سامة للفطر *A. amstelodami* وهذه التراكيز هي 1.6، 3.2، 4.8 و 6.4 مايكروغرام/مل لدراسة تأثيرها التطفيري على الفطر المذكور.

ومن الجدول (2) نلاحظ أن متوسط أقطار المستعمرات النامية تأخذ بالتناقص التدريجي بزيادة تركيز العقار 8-MOP وتوقف النمو تماماً حول نقطة الوخز عند التركيز 160 مايكروغرام/مل من الوسط M. وهذا يعني أن التركيز 160 مايكروغرام/مل هو التركيز الأدنى للعقار 8-MOP المثبط لنمو الفطر *A. amstelodami*.

2- التأثير المثبط للكحول الاثيلي في نمو *A. amstelodami*.

بما أن السورالينات قد اذيب في الكحول الاثيلي المطلق لكونها غير قابلة للذوبان في الماء، بات من الضروري دراسة التأثير التثبيطي والتطفيري لهذا المذيب. وقد تم دراسة التأثير التثبيطي للكحول بإضافة حجوم متصاعدة من الكحول بدءاً من 0.1مل وحتى 3مل لكل 100مل من الوسط M. ودُرس تأثير هذه التراكيز على اقطار المستعمرات تماماً، كما جرت دراسة ذلك في حالة السورالينات، والجدول(3) يبين أن كحول الاثيلي لغاية التركيز 3مل/100مل من الوسط ليس لهُ تأثير تثبيطي في نمو الفطر علماً أن تركيز الكحول في معاملات السورالينات المدروسة لم يتجاوز 0.8مل/100مل من وسط النمو.

الجدول 1: قطر المستعمرات (سم) للفطر *A. amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة من العقار Trisoralen بطريقة الوخز (Point inoculation)

تركيز العقار مايكروغرام/مل	قطر المستعمرات (سم)				المتوسط
	r_1	r_2	r_3	r_4	
0	2.9	3.0	2.9	2.9	2.92
0.8	2.9	2.8	3.0	2.8	2.87
1.6	2.8	2.8	2.9	2.8	2.82
3.2	2.7	2.7	2.6	2.9	2.72
6.4	2.6	2.6	2.5	2.5	2.55
8.0	1.4	1.5	1.6	1.2	1.42
16.0	1.5	1.5	1.3	1.2	1.37
32.0	0.7	0.7	0.5	0.7	0.55
48.0	0.2	0.2	0	0.1	0.12
56.0	0	0	0	0	0

الجدول 2: قطر المستعمرات (سم) للفطر *A. amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة من العقار 8-MOP بطريقة الوخز (Point inoculation)

تركيز العقار مايكروغرام/مل	قطر المستعمرات (سم)				المتوسط
	r_1	r_2	r_3	r_4	
0	2.4	2.5	2.4	2.5	2.45
1.6	2.5	2.5	2.4	2.4	2.45
3.2	2.4	2.4	2.5	2.4	2.42
6.4	2.5	2.3	2.4	2.4	2.40
8	2.0	2.3	2.2	2.3	2.20
20	1.0	0.9	0.9	1.1	0.97
40	0.6	0.5	0.7	0.6	0.60
80	0.3	0.2	0.2	0.3	0.25
120	0.2	0.1	0	0.1	0.1
160	0	0	0	0	0

الجدول 3: قطر المستعمرات (سم) للفطر *A. amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة من الكحول بطريقة الوخز (Point inoculation)

تركيز العقار مايكروغرام/مل	قطر المستعمرات (سم)				المتوسط
	r_1	r_2	r_3	r_4	
0	2.2	2.3	2.2	2.2	2.22
0.5	2.3	2.0	2.4	2.2	2.22
1	2.3	2.3	2.1	2.2	2.20
2	2.1	2.3	2.3	2.1	2.20
3	2.1	2.2	2.3	2.2	2.20

الجدول 4: تكرار الطافرات (x 10^{-7}) المقاومة المستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد تعريضها للكحول الأثيلي والأشعة UVA (365nm)

فترة التشعيع (دقيقة)	تركيز الكحول مل/100مل	قطر المستعمرات (سم)			المتوسط
		r_1	r_2	r_3	
0	0	0.09	2.81	0.15	1.02
	0.2	0.00	3.28	0.13	1.13
	0.4	0.06	3.26	0.29	1.20
	0.6	0.06	2.62	0.16	0.95
	0.8	0.05	2.65	0.00	0.90
10	0	0.05	2.83	0.37	1.08
	0.2	0.13	2.85	0.00	0.99
	0.4	0.04	2.29	0.18	1.05
	0.6	0.00	2.46	0.56	1.00
	0.8	0.06	3.26	0.08	1.13
20	0	0.04	3.22	0.00	1.09
	0.2	0.12	2.53	0.00	0.88
	0.4	0.05	2.61	0.23	0.96
	0.6	0.08	2.75	0.00	0.94
	0.8	0.19	2.96	0.59	1.24
30	0	0.00	2.39	0.35	0.91
	0.2	0.09	2.77	0.00	0.95
	0.4	0.00	2.15	0.15	0.77
	0.6	0.00	2.55	0.29	0.95
	0.8	0.06	2.74	0.11	0.97
40	0	0.04	3.11	0.59	1.25
	0.2	0.00	2.7	0.14	0.95
	0.4	0.03	2.91	0.33	1.09
	0.6	0.06	3.53	0.29	1.29
	0.8	0.08	2.87	0.43	1.13

3- اختبار التأثير التطفيري للكحول الأثيلي المطلق

تم دراسة التأثير التطفيري للكحول بطريقة المعاملة المسبقة وكما وصفها (شناوه، 1996) واستعمل الكحول بالتراكيز 0.2، 0.4، 0.6، 0.8مل/100مل من وسط النمو علماً أن هذه التراكيز هي نفسها التي استخدمت في حالة اضافة محلول العقار (ترايسورالين والميثوكسي سورالين) في الكحول ومن الجدول (4) نلاحظ عدم وجود تأثير تطفيري للكحول الاثيلي وبالتراكيز المستخدمة، في كونيدات الفطر *A. amstelodami* ومن خلال استعراض العوامل الفيزيائية والكيميائية ذات التأثير الوراثي في الفطر *A. nidulans* لم يذكر كل من Crebelli and Careve (1987) وجود تأثير وراثي للكحول في الفطر الا في تقرير واحد للباحثة Kafer (1984) وقد ذكرت أن الكحول الاثيلي يمكن أن يؤدي الى حدوث خلل في توزيع الكروموسومات أثناء عملية الانقسام النووي لكنها لم تُشِر الى حث طفرات جينية

كذلك التي نبحث عنها في بحثنا الحالي، كما أن الباحثة استخدمت تركيزاً نهائيـاً مـن الكحـول قـدرهُ 6مل/100مل من الوسط وهو اعلى بكثير من اعلى تركيز استخدم في التجربة الحالية (0.8مل/100مل من الوسط).

4- اختبار التأثير التطفيري للترايسورالين بطريقة التضمين في الطبق

في هذه الطريقة جرت عملية نشر كونيدات الفطر *A. amstelodami* على الوسط M الحاوي على العقار ترايسورالين مع وجود المادة الانتقائية (8-azaguanine) ثم عرضـت الأطبـاق للأشـعة UVA وللفترات 10، 20، 30 و 40دقيقة. ومن الجدول (5) نلاحظ أن متوسط تكرار الطافرات المقاومـة فـي غياب الإشعاع وغياب العقار كان 1.56×10^{-7} وهذا يمثل متوسط تكرار الطافرات التلقائيـة وبإضـافة التراكيز 1.6، 3.2، 4.8 و 6.4 مايكروغرام من العقار/مل من وسط الـنمو وبغياب الإشعاع حصلنا على متـوسطات تكرار للطافرات المقاومة كانت قـريبة من تكرار الطافرات الـتلقائية وهـذا يشير الى أن العقار بمفرده ليس لهُ تـأثير تطفيـري ذو أهمية في كـونيدات الفطر في ظـروف التجربـة الحاليـة بالرغم من أن عـدداً من الباحـثين قد أشاروا الى كـون بعض السورالينات مطفرة ضعيفة الا بيـد أن عـديد مـن الباحثـين ينفون كون السورالينات بذاتها وبـدون تنشـيط بواسـطة UVA أن تكـون مطـفرة (Averbeck, 1985). وكذلك أعطت جميع المعاملات الخالية من العقار والمعرضـة لفتـرات الإشعاع فقط تكرارات جميعها قريبة من تكرار الطافرات التلقائية، بينما أدى الإشعاع وبجميع فتراته الى حصول زيادة واضحة في متوسط تكرار الطافرات المقاومة على الأوساط الحاوية على العقـار مقارنـة بتكراراتها التلقائية أو المستحثة بالعقار لوحده أو بالإشعاع لوحده وكما هو مبين في الجـدول (5) فـان تكرار الطافرات يزداد بوجود العقار والإشعاع ولكن ليس لفترة الإشعاع أثر في زيادة تكرار الطـافرات، بل يكفي أن تتعرض الكونيدات المعاملة بالعقار لأقل فترة تشعيع وهي في هذه الحالة 10 دقائق، وربمـا تكون فترة التشعيع أقل من ذلك ولكن لم يتم اختبار فترات أقل من 10 دقائق في هذه الدراسة.

الجدول 5: تكرار الطافرات ($x 10^{-7}$) المقاومة المستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد تعريضها Trisoralen والأشعة UVA (365nm) بطريقة التضمين في الطبق

فترة التشعيع (دقيقة)	تركيز الكحول مايكروغرام/مل	قطر المستعمرات (سم)			المتوسط
		r_1	r_2	r_3	
0	0	1.74	1.27	1.69	1.56
	1.6	2.96	1.36	2.5	2.27
	3.2	3.22	1.52	2.27	2.33
	4.8	3.09	1.19	2.13	2.13
	6.4	3.16	1.50	2.33	2.33
10	0	2.77	1.63	2.29	2.23
	1.6	10.06	9.11	15.88	11.68
	3.2	11.41	10.75	18.74	13.63
	4.8	15.80	12.00	22.16	16.65
	6.4	16.77	13.02	24.41	18.06
20	0	2.45	1.44	2.16	2.00
	1.6	10.45	10.38	17.06	12.63
	3.2	13.16	11.00	22.97	15.71
	4.8	16.25	12.80	23.49	17.51
	6.4	17.22	14.02	24.94	18.72
30	0	2.64	1.47	2.58	2.23
	1.6	11.54	10.08	18.08	13.23
	3.2	14.25	11.44	21.58	15.75
	4.8	16.32	10.41	25.11	17.28
	6.4	17.48	14.58	25.52	19.19
40	0	2.90	1.86	2.66	2.47
	1.6	10.12	9.52	18.58	12.74
	3.2	12.83	10.58	19.22	14.21
	4.8	14.90	11.05	22.55	16.16
	6.4	16.70	13.02	27.41	19.04

وقد أجري تحليل التباين بموجب التصميم العشوائي الكامل على القيم الناتجة في (جدول 6) بعد أخذ الجذر التربيعي ولأجل توزيع الاختلافات بين الوحدات التجريبية على مصادرها المختلفة (الراوي وعبد العزيز، 1980)، تبين أن هناك فرقاً معنويا بين تأثير فترات التشعيع تحت مستوى احتمال 5% وكذلك ظهرت فروق معنوية بين تأثير تراكيز الدواء المختلفة وكذلك أظهر التداخل بين العاملين فترات التشعيع وتراكيز الدواء تأثيراً معنوياً في زيادة معدل الطافرات المقومة. ولذلك أجري اختبار دنكن المتعدد الحدود (الجدول 7) لاختبار ما اذا كانت متوسطات تكرار الطافرات الناتجة عن المستويات المختلفة للإشعاع يختلف بعضها عن البعض، وكذلك لاختبار ما إذا كانت متوسطات التراكيز المختلفة من العقار يختلف بعضها عن البعض وكذلك لمقارنة متوسطات التداخل بين الإشعاع والعقار. وقد تبين أن متوسطات تأثير الإشعاع لوحده وللفترات 10، 20، 30 و40 دقيقة لم تختلف بعضها عن البعض الأخر اختلافاً معنوياً

تحت مستوى احتمال 5%، ومن الجدول (6) نلاحظ أن تعريض الكونيدات غير المعاملة بالعقار للأشــعة UVA ولمختلف الفترات ادى الى ارتفاع في تــكرار الــطافرات المقاومة ولكن هذه التكرارات قريبــة من التكرار التلقائي (1.56×10^{-7}). ويشــير ذلك الى أن اشعــة UVA المــستخدمة فــي البحث الحالي ليس لها تأثير تطفيري، وهذا ينسجم بما ذكرهُ كل من Alderson and Scott (1970) اذ نفيــا أن يكــون للأشــعة UVA بمــفردها تأثير تــطفــيري في كونيــدات الــفطر *A. nidulans* بالرغم من أن Tyrell and Keyse (1990) يذكر إن UVA لها تأثيراً تطفيرياً في الخلايا المزروعــة. كمــا اســند كــل مــن Drobetsky (1995) وجماعته و Sage (1997) دوراً تطفيرياً للأشعة UVA لوحدها.

الجــدول6: تــحليل الــتبايــن لتــكرار الــطافــرات المقــاومة المستحــثة في كــونيدات الــفطر *A. amstelodami* المعاملة بالعقار Trisoralen

مصادر الأختلاف S.O.V	درجات الحرية d.f	مجموع المربعات SS	تباين المربعات MS	قيمةFالمحسوبة Cal.F	قيمةFالجدولية Tab.F
فترة الإشعاع A	4	47.52	11.88	48.22*	2.56
تركيز الدواء B	4	56.89	14.22	57.74*	2.56
التداخل A×B	16	11.00	0.68	2.79*	1.85
الخطأ التجريبي Error	50	12.31	0.24		
الكلي Total	74	127.72			

- تدل على وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال 5%

أما بالنسبة لتراكيز العقار فقد أظهــر اختبــار دنكــن أن متوســطات التراكيــز 3.2، 4.8 و 6.4 مايكروغرام/مل لم يختلف تأثيرها معنوياً بعضها عن البعض عند مستوى احتمال 5%. وقد اختلف تأثير التركيزين 4.8 و 6.4 مايكروغرام/مل معنوياً عن تأثير التركيز 1.6 مايكروغرام/مل. بينما تماثل تــأثير التركيز 3.2 مايكروغرام/مل مع التركيز 1.6 مايكروغرام/مل. وهذا قد يشير الى أن هناك عدداً محدوداً من المواقع التي يمكن لجزيء السورالين أن ينحشر أو يندس بين أزواج قواعد الــ DNA، يتراوح بــين 2-6 جزيئة لكل 100 زوج من قواعد الــ DNA وهذا يعتمد على عوامل كثيرة منها مكونات الــ DNA من القواعد وتسلسلها وعلى مشتق السورالين المستعمل (Weisehahn and Hearst, 1978) فإن صح هذا التفسير فان افضل التراكيز من الناحية الاقتصــادية فــي اســتخدام الترايســورالين كــدواء هــو 3.2 مايكروغرام/مل.

أما بالنسبة للتداخل بين تأثير الإشعاع وتأثير العقار فقد أظهر تحليل التبــاين وبعــد أخــذ الجــذر التربيعي لتكرار الطافرات تأثيراً معنوياً لهذا التداخل في زيادة تكرار الطافرات، ومن خلال اختبار دنكن

لمقارنة متوسطات الطافرات عند مستوى احتمال 5% تبين أن المعاملات الستة عشر التي تمثل (فترات الإشعاع الأربعة الفعلية × تراكيز العقار الأربعة الفعلية) لم تختلف معنوياً فيما بينها ولكنها جميعاً اختلفت عن المعاملات (صفر اشعاع × تراكيز العقار الخمسة) وكذلك اختلف معنوياً عن المعاملات (صفر عقار × فترات التشعيع الخمسة) في حين أن المعاملات (صفر للعقار × فترات الشعيع المختلفة) و (صفر إشعاع × تراكيز العقار المختلفة) لم تختلف معنوياً فيما بينها. وهذا يعني أن أي من معاملات التداخل الفعلية الستة عشر بين العقار والإشعاع تكفي لأحداث زيادة في تكرار الطافرات المستحثة بفعل التفاعل الضوئي بين السورالين والحامض النووي الـ DNA.

الجدول 7: اختبار دنكن لمقارنة متوسطات الطافرات المقاومة عند مستوي احتمال 5% والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد معاملتها بالعقار Trisoralen والأشعة UVA بطريقة التضمين في الطبق

فترة التشعيع (دقيقة)	تركيز العقار (مايكروغرام/مل) 0	1.6	3.2	4.8	6.4	متوسطات تأثير فترة التشعيع
0	1.56 b	2.27 b	2.33 b	2.13 b	2.33 b	2.12 b
10	2.23 b	11.68 a	13.63 a	16.65 a	18.06 a	12.45 a
20	2.00 b	12.63 a	15.71 a	17.51 a	18.72 a	13.31 a
30	2.23 b	13.23 a	15.75 a	17.28 a	19.19 a	13.53 a
40	2.47 b	12.74 a	14.21 a	16.16 a	19.04 a	12.92 a
متوسطات تأثير تركيز العقار	2.10 c	10.51 b	12.32 ab	13.95 a	15.47 a	

المتوسطات التي تحمل نفس الحروف لاتختلف معنوياً

5- اختبار التأثير التطفيري للميثوكسي سورالين

لوحظت التأثيرات التطفيرية لهذا العقار في مختلف الكائنات الحية اعتباراً من البكتريا الى خلايا الإنسان المزروعة (Sage, 1997) والعقار 8-MOP هو سورالين ثنائي الفعالية (Hearst et al., 1984). وقد جرى استعمال العقار 8-MOP في البحث الحالي بوصفه مطفراً مؤكداً حين تفاعله مع UVA وأتخذ سيطرة ايجابية (Positive control) للتأكد من استجابة الفطر المستخدم للمطفرات الكيميائية ومقارنة نتائجه بالنتائج التطفيرية للسورالين المدروس (Trisoralen)، وقد جرى دراسة التأثير التطفيري للميثوكسي سورالين بطريقة التضمين في الطبق وبظروف تجريبية (من تراكيز العقار وفترات الإشعاع وطريقة المعاملة) مطابقاً لما جرى للعقار ترايسورالين المدروس بهذه الطريقة. والجدول (8) يبين تكرار الطافرات المقاومة للمادة السامة 8-azaguanine والمستحثة بوجود العقار 8-MOP والأشعة فوق البنفسجية UVA. وقد كان تكرار الطافرات المستحثة بفعل العقار لوحده قريباً من تكرار الطافرات

التلقائية والذي كان 0.14×10^{-7}، وكذلك بالنسبة لتكرار الطافرات التي تم الحصول عليها في حالة التعرض للأشعة UVA وبفتراتها المختلفة ولكن بدون العقار فقد كان ايضاً قريباً من التكرار التلقائي. أما في حالة تعرض الكونيدات لكل من 8-MOP وأشعة UVA معاً فقد حصلت زيادة واضحة في تكرار الطافرات عن تكرارها التلقائي ففي داخل فترة التشعيع الواحدة تصاعدت هذه الزيادة، وبوجه عام مع زيادة تركيز العقار ومع الزيادة في فترة التشعيع، ومن خلال اجراء تحليل التباين على البيانات في جدول (8) تبين وجود فروقات معنوية بين تأثير تراكيز العقار لوحده وكذلك ظهرت فروقات معنوية بين فترات التشعيع وكان التداخل بين فترات التشعيع وتراكيز العقار معنوياً أيضاً (جدول9) وكذلك فقد جرى اختبار دنكن عند مستوى احتمال 5% لمقارنة متوسطات فترات الشعيع فيما بينها ومقارنة متوسطات التراكيز فيما بينها ومقارنة متوسطات التداخل فيما بينها. وقد تبين (جدول10) أن فترة التشعيع 30 دقيقة أعطت أعلى تأثير في متوسط تكرار الطافرات أما بالنسبة لتأثير تراكيز العقار فان التركيز 6.4 مايكروغرام/مل أظهر أعلى زيادة في متوسط تكرار الطافرات، أما بالنسبة لتأثير التداخل بين تركيز العقار وفترات الإشعاع فانة في غياب التشعيع لم يظهر بين التراكيز المختلفة للعقار تأثير في متوسط تكرار الطافرات وكذلك لم تختلف فترات الإشعاع فيما بينها في غياب العقار في التأثير في متوسط تكرار الطافرات. كما أن تأثير فترات التشعيع المختلفة بدون العقار وتأثير تراكيز العقار المختلفة بدون إشعاع قد شابه تأثير المعاملة (صفر عقار × صفر التشعيع) أي التكرار التلقائي. أما بالنسبة لتأثير العقار والإشعاع معاً فقد أزداد تكرار الطافرات بزيادة التركيز وبزيادة فترة التشعيع وكانت احسن معاملة هي فترة التشعيع لمدة 30 دقيقة وبوجود تركيز 3.2 مايكروغرام من العقار/مل، اذ بلغ تكرار الطافرات 12.25×10^{-7} وهذا يعادل(87.5 مرة) بقدر التكرار التلقائي البالغ 0.14×10^{-7}. أن النتائج التي تم الحصول عليها في هذه التجربة تؤكد النتائج التي وجدها Alderson and Scott (1970) من حيث أن 8-MOP لوحده أو UVA لوحدها غير مطفرة لكونيدات الفطر A.nidulans ولكن حين معاملة الكونيدات بالعقار 8-MOP ومن ثم تعريضها الى أشعة UVA أرتفع تكرار الطافرات أرتفاعاً شديداً وهذا الشيء حصل في تجربتنا الحالية مع الفطر *A. amstelodami* مما يشير الى أن المعاملة 8-MOP + UVA هي معاملة مطفرة ايجابية وان فطرنا *A. amstelodami* يستجيب لهذه المعاملة ولاخلل في استجابته للمطفرات. وقد اشارت الدراسات الى أن التأثيرات التطفيرية للـ 8-MOP تعتمد على التركيز وعلى جرعات UVA (Yatagai and Glickman, 1986).

الجدول 8 : تكرار الطافرات ($x\ 10^{-7}$) المقاومة المستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد تعريضها للعقار 8-Methoxypsoralen والأشعة UVA (365nm) بطريقة التضمين في الطبق

المتوسط	r_3	r_2	r_1	تركيز العقار مايكروغرام/مل	فترة التشعيع (دقيقة)
0.14	0.11	0.12	0.19	0	0
0.20	0.18	0.12	0.31	1.6	
0.26	0.26	0.21	0.31	3.2	
0.24	0.22	0.16	0.35	4.8	
0.23	0.22	0.12	0.35	6.4	
0.25	0.26	0.12	0.39	0	10
1.59	2.70	1.17	0.91	1.6	
2.95	3.19	2.85	0.82	3.2	
4.39	4.39	5.54	3.26	4.8	
6.29	5.93	7.43	5.53	6.4	
0.26	0.37	0.16	0.27	0	20
2.98	2.96	2.81	3.18	1.6	
5.66	5.33	5.04	6.61	3.2	
6.95	5.90	8.40	6.57	4.8	
10.13	8.87	11.38	10.15	6.4	
0.28	0.37	0.25	0.23	0	30
6.76	6.09	6.84	7.37	1.6	
12.25	10.72	11.97	14.02	3.2	
10.08	10.00	10.25	10.00	4.8	
11.34	11.84	11.68	10.15	6.4	
0.26	0.26	0.21	0.31	0	40
6.44	6.65	7.89	4.78	1.6	
10.93	8.98	10.88	12.94	3.2	
9.03	10.45	7.10	9.56	4.8	
10.34	9.13	10.92	10.99	6.4	

الجدول 9: تحليل التباين لتكرار الطافرات المقاومة المستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* المعاملة بالعقار 8-MOP والأشعة UVA (365nm)بطريق التضمين في الطبق

قيمةFالجدولية Tab.F	قيمةFالمحسوبة Cal.F	تباين المربعات MS	مجموع المربعات SS	درجات الحرية d.f	مصادر الأختلاف S.O.V
2.56	279.18*	11.67	46.69	4	فترة الإشعاع A
2.56	243.30*	10.17	40.68	4	تركيز الدواء B
1.85	19.12*	0.79	12.79	16	التداخل A×B
		0.041	2.09	50	الخطأ التجريبي Error
			102.25	74	الكلي Total

- تدل على وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمال 5%

الجدول 10 : اختبار دنكن لمقارنة متوسطات الطافرات المقاومة عند مستوي احتمال 5% والمستحثة في كونيدات الفطر *A. amstelodami* بعد معاملتها بالعقار 8-MOP والأشعة UVA بطريقة التضمين في الطبق

فترة التشعيع (دقيقة)	تركيز العقار (مايكروغرام/مل)					متوسطات تأثير فترة التشعيع
	0	1.6	3.2	4.8	6.4	
0	0.14 h	0.20 h	0.26 h	0.24 h	0.23 h	0.21 e
10	0.25 h	1.59 gh	2.95 fg	4.39 ef	6.29 d	3.09 d
20	0.26 h	2.98 fg	5.66 de	6.95 d	10.13 bc	5.20 c
30	0.28 h	6.76 d	12.25 a	10.08 c	11.34 bc	8.14 a
40	0.26 h	6.44 d	10.93 bc	9.03 c	1.34 bc	7.40 b
متوسطات تأثير تركيز العقار	0.24 d	3.59 c	6.41 b	6.14 b	7.67 a	

المتوسطات التي تحمل نفس الحروف لاتختلف معنوياً

المصادر العربية

الحمداني، غادة عبدالله، 1985. وراثة المقاومة للأدوية في لبفطر اسبرجلس امستيلودامي. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة الموصل/العراق.

الراوي، خاشع محمود وعبدالعزيز محمد خلف، 1980. تصميم وتحليل التجارب الزراعية. مؤسسة دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل.

جرجيس، رافعة قادر، 1984. تحليلات وراثية في الفطر اسبرجلس امستيلودامي. رسالة ماجستير. كلية العلوم، جامعة الموصل/العراق.

شناوه، ابراهيم محمود، 1998. الأثر الطفري للنبليت و 2,4-D في الفطر اسبرجلس امستيلودامي. اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل/العراق.

المصادر الأجنبية

Ahmad, B. and Gerd, P.P., 2004. Biological consequences of 8-Methoxypsoralen photoinduced lesions: Sequence-Specificity of mutation and preponderance of T to C and T to A mutations. *The Journal of Investigative Dermatology 123*: pp.1140-1146.

Alderson, M.R. and Scott, B.R., 1970. The photosensitisig effect of 8-MOP on the inactivation and mutation of Aspergillus conidia by near ultaviolet light. Mutat. *Res., 9*: pp.569-578.

Averbeck, D., 1985. Relationship between Lesions photoinduced by mono and bifunctional furocoumrins in DNA and genotoxic effects in diploid yeast, Mutat. *Res., 151*: 217 p.

Bordin, F., Dall'Aqua, F., and Guiotto, A., 1991. Angellicins, angular analogs of Psoralen. *Pharmac. Ther., 52*: pp.331-363.

Bredberg, A. And Nachmanson, N. 1987. Psoralen adducts in ashuttle vector plasmid of propagated in primate cells: high mutagenicity of DNA cross-links. *Carcinogenesis, 8:* pp.1923-1927.

Caten, C.E., 1979. Genetical determination of condial colour in Aspergillus heterocaryoticus and relatonship of this species to *Aspergillus amstelodami.* Trans. *Bri. Mycol. Soc. 73*: pp.65-74.

Cerbelli, R. and Careve, A., 1987. Chemical and Physical agents assayed in tests for mitotic intergenic and and intragenic recombination in Aspergillus nidulans. *Mutagenesis, 2*, pp.449-475.

Clutterbuck, A.J., 1977. Aspergillus nidulans R.C. King (ed.) in Handbook of genetics. vol., I: New York, plenum press pp.447-500.

Cohen, L.F., Ewig, R.A.G., Kohn, K.W. and Glaubiger, D., 1980. Interstand DNA crosslinking by 4,5,8-trimethylpsoralen plus monochromatic ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Acta.* 610: pp.56-63.

Duval-Valentin, G., Takasugi, M., Helene, C. and Sage, E., 1998. Triple Helic-directed psoralen crosslinks are recogenized by Uvr (ABC) Exeinuclease. *J. Mol. Biol., 278*, pp.815-825.

Eileen, Q., S, Yuhun L. A. L., Raon, S. Robert, G., P, Lisa M. A., Mark L. and Huachen W., 2002. Effects of the isoflavine 4,5,7-trihydroxyisoflavone on psoralen plus ultraviolet A radiation-induced photodamage *Carcinogenesis, 23*, pp.317-321.

Hearst, J.E., Isaacs, S.T., Kanne, D., Rapoport, M. and Straub, K., 1984. Reaction of psoralens with DNA. Quart. Rev. Biopphys., 17: pp.1-44.

Kafer, E., 1984. Disruptive effects of ethylalcohol on mitotic chromosome segregation in diploid and haploid strains of Aspergillus nidulans. Mutat. Res., 135: pp.53-75.

Papadopoulo, D., Averbeck, D. and Moustacchi, E., 1988. High levels of 4,5,8-trimethylpsoralen (TMP) phptinduced furan-side monoadducts can block cross-link removal in normal human cells. *J.Photochem. Photobiol. 47*: pp.321-326.

Rousset, S., Nocentini, S., Santella, R.M., Moustacchi, E. 1997. 6,4,4-Trimethylangelicin photoadduct immunodetection in DNA. *J.Photochem. Photobiol., 38*: pp.220-227.

Sage, E., 1997. Mutational specificity of solar ultraviolet light in rodent cells. *Trends. Photobiol., 4*: pp.117-123.

Scott, B.R. and Kafer, E., 1982. Aspergillus nidulans. An organism for detecting a range of genetic damage. *Chemical mutagens, 7*: pp.447-479. Plenum, New York.

Song, P.S. and Tapley, K.J., 1979. Photochemistry and photobiology of psoralens. *J.Photochem. Photobiol., 29*; pp.1177-1197

Tyrell, R.M. and Keyes, S.M., 1990. The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol., 4*: pp.349-361.

Weisehahn, G. and Hearts, J.E., 1978. DNA unwinding induced by photoaddition of psoralen derivatives and determination of darkbinding equillbrium constants by gel-electrophoresis. *J.Proc. Natl. Acad. Sci USA. 75*: pp.2703-2707.

Yatagai, F. and Glickman, B.W., 1986. Mutagenesis by 8-methoxypsoralen plus near-uv treatment. *Mutant. Res. 163*:209-224.