------مجلة علوم الرافدين، المجلد 23، العدد 4، ص1-11، 2012------

عزل طافرات لونية ومقاومة في الفطر *Alternaria alternata*

ساهي جواد ضاحي **هدى وليد هادي**

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

fhnam2009@ Yahoo.com

(تاريخ الاستلام 12/ 12 /2011 ؛ تاريخ القبول 30 /4 / 2012)

الملخص

عزل ما مجموعه (31) طافرة بيضاء اللون (W) أومقاومة للمادة السامة كلورات البوتاسيوم (Chl) او مقاومة للمادة السامة سلينات الصوديوم (Sel) من السلالة البرية السوداء AA1 من الممرض النباتي الفطر*Alternaria alternata* ولقد تبين ان تعريض كونيدات هذا الفطر الى اشعة UV لمدة 20 دقيقة وعلى بعد 10 سم من مصدر الاشعاع قد أدى الى قتل اكثر من 90% من الكونيدات المعرضة، وقد اعتمدت هذه الظروف لحث الطافرات المختلفة. لقد جرى مبدئيا عزل ثلاث طافرات بيضاء هيSW1 و SW2 و SW3 والتي ظهرت بوصفها قطاعات بيضاء بعد يومين من تشعيع مستعمرات عمرها يومان من السلالة السوداء AA1. كما تبين ان التراكيز 100، 60، 100، 80 مليمولار من كلورات البوتاسيوم او التراكيز 200، 280، 280 ، 200 مليمولارمن سلينات الصوديوم هي تراكيز قاتلة للسلالات AA1 وSW1 وSW2 وSW3 على الترتيب. وقد أُعتمدت هذه التراكيز لعزل طافرات مقاومة لهاتين المادتين من تلك السلالات. وقد جرى عزل 20 طافرة تلقائية مقاومة للكلورات خمس منها (Chl5-Chl9) من السلالة AA1 وخمس عشرة (Chl13-Chl27) من السلالة SW3. وجرى عزل خمس طافرات مقاومة للسلينات (Sel1 -Sel5) من تشعيع كونيدات السلالة SW2 وجرى عزل طافرة واحدة Chl10 من تشعيع كونيدات السلالة AA1. اما الطافرة المزدوجة البيضاء المقاومة للكلورات (SW4) فقد جرى عزلها من تشعيع الطافرة Chl10. ويُؤمل ان تشكل هذه المجموعة من الطافرات بداية للبحث الوراثي في هذا الفطر المهم اقتصاديا.

الكلمات الدالة : *Alternaria alternata*، طافرات، ميلانين، وراثة.

Isolation of Colour and Resistant Mutants in *Alternaria alternata*

Sahi J. Dhahi **Huda W. Hadi**
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

A total of (31) white (W) and/or resistant to potassium chlorate (Chl) or sodium selenate (Sel) mutants were isolated from strain AA1; a black wild type strain of the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. Exposing conidia of this stain to 20 min UV at a 20 cm – distance was found to kill more than 90% of the conidia and these conditions were adopted to isolate various mutants.Three white mutants; SW1, SW2 and SW3 were isolate as white sectors after two days of irradiating two-day old colonies of AA1. Concentrations of 100, 60, 100 and 80mM potassium chlorate or concentrations of 200, 280, 280 and 200mM sodium selenate completely inhibited the growthof strains AA1, SW1, SW2 and SW3 respectively and these concentrations were used to isolate the various resistant mutants. Twenty spontaneous chlorate- resistant mutants were isolated from strain AA1(Chl5-Chl9) and strain SW3(Chl13-Chl27). Five Sel mutants (Sel1-Sel5) and one chlorate resistant (Chl10) mutants were isolated from irradiating conidia of SW2 and AA1respectively. The double mutants SW4, white conidia and chlorate resistant, was isolated by irradiating conidia of Chl10. This collection of mutants should allow startingthe genetic analysis of this important fungus.

المقدمة

الفطر *A.alternata* من الفطريات الهايفومايسيتية (Hyphomycetes) الواسعة الانتشار في العـالم إذ يتواجد هذا النوع والأنواع الأخرى العائدة لجنس الالترناريا في مختلف البيئات وفي كل أنحاء العالم وحـين تسنح الفرصة تتحول هذه الأنواع إلى ممرضات تصيب العديد مـن المحاصـيل الحقليـة مـسببة خـسائر اقتصادية كبيرة (Thomma, 2003). كما إن ابواغ هذه الفطريات تعد من أكثر محسسات الجهاز المنـاعي للإنسان المنتشرة في الهواء بل إن بعض هذه الأنواع قد تصيب الأفراد وخاصة أولئـك المثبطـين مناعيـا (Zapatero *et al.*, 2011). وُتعزى قدرة هذه الفطريات على إصابة أطياف واسعة من النباتات إلى إنتاجهـا العديد من السموم المتخصصة لمضائف مختلفة (Host Specific Toxins) كل منها متخصص ضد مضيف نبـاتي معـين. والـسموم الفطريـة هـذه هـي منتجـات ايـضية ثانويـة (Secondarymetabolites) (Stuart *et al.*, 2009). كما تتميز فطريات هذا الجنس ومنها الفطر *A.alternata* بإنتاجها لصبغة الميلانين السوداء في الغالب (Kimura and Tsuge, 1993) والتي يعتقد بان لها دورا هاما فـي إمراضـية أنـواع

مختلفة من الفطريات ومقاومتها للظروف القاسية من جفاف وحرارة وأشعة فوق بنفسجية (UV). والميلانين هو الأخر ناتج ايضي ثانوي تفرزه هذه الفطريات (Jacobson, 2000).

وتمتاز كونيدات هذا الفطر بأنها متعددة الخلايا (Multicellular) إضافة إلى كون عدد من الخلايا في الكونيدة الواحدة هي خلايا متعددة الانوية (Huang *et al*., 1996). وهذا يجعل من عزل طافرات وراثية في هذا النوع أمراً صعباً للغاية (Fincham *et al*., 1979) مما حد كثيراً من اجراء الدراسات الوراثية القياسية في هذا الفطر. يَهدُف البحث الحالي إلى عزل طافرات مورفولوجية أو مقاومة لبعض المواد السامة تمهيداً لاستعمالها في دراسة الجهاز الوراثي لهذا الفطر والذي يعد أساساً لفهم فسلجة الفطر واقتراح آليات فعالة لمكافحته بوصفه ممرضاً نباتياً هاماً (Barkai-Golan, Host Specific Toxins 2008).

المواد وطرائق العمل

السلالة:

استعملت السلالة AA1 السوداء الكونيدات والبرية الاحتياجات الغذائية و المعزولة أصلاً من نباتات الباقلاء في منطقة الموصل (الطائي، 2007). وقد استعملت هذه السلالة لعزل السلالات الفاقدة للميلانين (البيض الكونيدات) وكذلك استعملت لعزل الطافرات المقاومة للمواد السامة، الكلورات و السلينات. كما جرى استعمال ثلاث عزلات أخرى هي SW1 وSW2 وSW3. وهذه سلالات جرى حثها باشعة UV في السلالة AA1 مبدئياً كطافرات بيض الكونيدات (لاحظ النتائج والمناقشة) وبرية في احتياجاتها الغذائية ثم استعملت مع السلالة AA1 بوصفها سلالات ابوية لعزل الطافرات المقاومة للمادتين السامتين الكلوراتوالسلينات.

الأوساط الزرعية وظروف الزرع:

استعمل وسط البطاطا دكستروز– اكار (Potato Dextrose Agar, PDA) (Pitt and Hocking, 2009) وذلك لغرض التنمية الاعتيادية والادامة كما استعمل لهذا الغرض أيضاً وسط البطاطا سكروز – اكار (Potato Sucrose Agar, PSA) وهو وسط (PDA) استبدل فيه سكر الدكستروز بما يساويه من السكروز (لوفرته). أما لأجراء اختبارات النمو او المقاومة للمواد السامة فقد جرى استعمال وسط الحد الأدنى Minimal (Medium, M) وهو وسط معرف تعريفا دقيقا في مكوناته الكيمياوية (Caten, 1979). وعند الحاجة إلى عد أعداد كبيرة من المستعمرات المنفردة والمنفصلة على الأوساط الصلبة يضاف إلى الوسط الملح (deoxycholate Sodium, D)، (Mackintosh and Pritchard, 1963) وذلك بتركيز 400 مايكروغرام/ مل من وسط النمو إذ وجِد أن هذا التركيز هو التركيز المناسب للفطر *A.alternata* في البحث الحالي وكانت جميع عمليات الزرع والتجارب تُجرى تحت ظروف معقمة وجرى التحضين عند الدرجة الحرارية $28C^{\circ}$.

أنواع الطفرات التي جرى عزلها:

عزل نوعين من الطافرات هما الطافرات اللونية والطافرات المقاومة لبعض الكيمياويات. إذ تم عزل طافرات بيضاء اللون (فاقدة للميلانين) كما تم عزل طافرات مقاومة للمادة السامة كلورات البوتاسيوم ($KClO_3$) وذلك حسب طريقة Cove (1976) في عزل طافرات من هذا النوع في الفطر *Aspergillus nidulans* كما جرى عزل طافرات مقاومة لسلينات الصوديوم (Na_2SeO_4) حسب طريقة (Arst, 1968) في الفطر *A. nidulans* ايضاً. وذلك بعد أن جرى تحديد التراكيز المثبطة الدنيا من كلتا المادتين السامتين وذلك من خلال زرع السلالات AA1 وSW1 وSW2 وSW3 وبطريقة الوخز على تراكيز متصاعدة منهما في الوسط الصلب وحسِبتْ النسبة المئوية للتثبيط من خلال ملاحظة الاختزال الحاصل في النمو الفطري للمستعمرات المزروعة على الوسط الصلب M الحاوي على التراكيز المختبرة من المادة الكيمياوية. وحسِبتْ نسبة التثبيط كالأتي:

النسبة المئوية لتثبيط نمو المستعمرة = (متوسط قطر المستعمرة على الوسط الكيميائية المادة بدون السامة – قطرها بوجود المادة السامة) / (متوسط قطر المستعمرة على الوسط بدون المادة السامة) × 100

وقد شمل هذا العزل طافرات تلقائية وطافرات مستحثة بالأشعة فوق البنفسجية (UV)، وذلك كما ورد في (الجاف، 1990) للفطر *Aspergillus amstelodami*. اذ جرى اختبار الظروف الملائمة للفطر الحالي من حيث مدة التعريض للأشعة (20 دقيقة) وبعد العالق الكونيدي عن مصدر الإشعاع (10سم) والتي أعطت شدة قتل في حدود 90% من الكونيدات المعرضة. وجرى حساب النسبة المئوية للأفراد الناجية من التشعيع كما يأتي :

النسبة المئوية للأفراد الناجية = (عدد المستعمرات النامية من المتوقعة المشععة العينة – عدد المستعمرات النامية من المتوقعة المشععة غير العينة) / (عدد المستعمرات النامية من العينة غير المشععة المتوقعة) × 100

وبذا تكون شدة القتل للمعاملة = 100– النسبة المئوية للأفراد الناجية

كُررت التجربة ثلاث مرات وجرى حساب متوسط شدة القتل والخطأ القياسي (Standard error, SE) لها من هذه المكررات الثلاث.

النتائج و المناقشة

التركيز المثبط الأدنى:

تباين التركيز المثبط الأدنى من الكلورات بين السلالات التي جرى اختبارها من الفطر *A. alternate* اذ تراوح بين 100 mM للسلالتين AA1 و SW2 و 80 mM للسلالة SW3 و 60 mM للسلالة SW1 (الجدول1). غير ان هذه التراكيز كانت مقاربة أو مشابهة للتراكيز السامة من هذه المادة للفطر *Aspergillus nidulans* (Cove, 1976). وليس من الواضح السبب الحقيقي لهذا الاختلاف في الحساسية بين السلالات من الفطر *A. alternate* إذ لايمكن أن يعزى إلى فقدان الميلانين رغم أن الميلانين يمنح السلالات الحاملة له بعض الحماية (Jacobson, 2000) وذلك لان السلالات الفاقدة للميلانين SW اختلفت هي الأخرى في درجة مقاومتها (الجدول1). وقد استعملت هذه التراكيز المثبطة لعزل سلالات طافرة مقاومة لهذه المادة من السلالات الأبوية المبينة في (الجدول 1).

أما بالنسبة لسلينات الصوديوم فقد قاومت هذه السلالات تراكيز عالية أعلى بصورة واضحة من مقاومتها للكلورات إذ تراوح التركيز المثبط الأدنى من سلينات الصوديوم بين 280 mM للسلالتين SW1 وSW2 و200 mM للسلالتين AA1 وSW3 (الجدول 2). ومرة أخرى لا يبدو أن هناك علاقة واضحة بين لون الفطر (وجود الميلانين من عدمه) في درجة المقاومة إذ لوحظت السلالة البيضاء SW3 تقاوم التركيز 200 mM ذاته الذي قاومته السلالة الأبوية السوداء AA1 (الجدول 2). ولكن على العموم فان سلالات *Alternaria* قاومت تراكيز أعلى بكثير من التراكيز التي قاومها الفطر *A. nidulans* من هذه المادة (Arst, 1968). وهذا ليس غريبا إذ أن الكائنات الحية تختلف في درجة مقاومتها للمواد السامة وذلك باختلاف الآليات المتبعة في المقاومة (Fincham *et al.*, 1979). وقد اعتمدت هذه التراكيز لعزل الطافرات المقاومة للسلينات في هذا الفطر.

الجدول1: متوسط قطر المستعمرة (سم) من الفطر *A. alternata* النامية لمدة خمسة أيـام علـى الوسـط الأدنى (M) الحاوي على تراكيز مختلفة من كلورات البوتاسيوم وتركيز ثابـت مـن نترتـرات الامونيوم (5 mM).

السلالة	كلورات البوتاسيوم (mM)	متوسط قطر المستعمرة (سم)	النسبة المئوية للتثبيط
AA1	0	0.56	
	20	0.36	35.7
	40	0.23	58.9
	60	0.13	76.7
	80	0.03	94.6
	100	0.00	100
SW1	0	0.60	
	20	0.30	50.0
	40	0.06	90.0
	60	0.00	100
SW2	0	0.37	
	20	0.26	64.3
	40	0.16	78.0
	60	0.06	91.0
	80	0.03	95.0
	100	0.00	100
SW3	0	0.46	
	20	0.23	50.0
	40	0.16	65.2
	60	0.03	93.4
	80	0.00	100

الجدول 2: متوسط قطر المستعمرة (سم) من الفطر*A.alternata* النامية لمدة خمسة أيـام علـى الوسـط الأدنى(M) الحاوي على تراكيز مختلفة من سلينات الصوديوم وتركيز ثابـت(0.2 mM) مـن الحامض الاميني D-Methionine.

السلالة	سلينات الصوديوم(mM)	متوسط قطر المستعمرة (سم)	النسبة المئوية للتثبيط
AA1	0	1.46	
	60	0.73	50
	160	0.06	95.8
	200	0.00	100
SW1	0	1.26	
	60	0.50	60.3
	160	0.50	60.3
	200	0.43	65.8
	240	0.20	84.1
	280	0.00	100
SW2	0	1.50	
	60	0.63	58.0
	160	0.53	62.6
	200	0.50	66.6
	240	0.50	66.6
	280	0.00	100
SW3	0	1.50	
	60	0.46	69.3
	160	0.43	71.3
	200	0.00	100

شدة القتل:

يظهرمن (الجدول 3) إن تعريض الكونيدات في عوالقها المائية إلى أشعة الـ UV ولمدة عشر دقائق وعلى بعد 10 سممن مصدر الإشعاع قد قتلت 74% من الكونيدات في حين أعطت مدة التعريض 20 دقيقة وعلى هذا البعد شدة قتل فاقت 90% من الكونيدات المعرضة. ولما كانت نسبة الطافرات تتناسب طرديا مع نسبة أو شدة القتل (Fincham *et al.*,1979) أي ان نسبة كبيرة من الأفراد الناجية (Survivals) ستكون طافرة لذا فقد اعتمدت هذه المعاملة 20 دقيقة تعريض وعلى بعد 10 سم من العالق بوصفها معاملة لعزل الطافرات من هذا الفطر. وقد تُعد هذه المعاملة قاسية قياسا بكائنات أخرى و التي تعطي شدة قتل مماثلة تحت ظروف اقل صرامة من المعاملة الحالية من حيث مدة التعريض والبعد عن مصدر الإشعاع (Auerbach, 1976) غير إن الحساسية للمطفرات تختلف باختلاف الكائنات الحية واليات الإصلاح المتوفرة لديها (Russell, 2010; Burnett, 2003). وربما يعزى هذا التحمل العالي لأشعةUV لدى الفطر.*A. alternata* إلى حقيقة أنكونيداته متعددة الخلايا وبعض خلاياها ربما تكون متعددة الانوية (Honda *et al*., 1990 ; Haung *et al*., 1996) ممايزيد من تحمله للإشعاع و يقلل من احتمال الكشف عن الانوية الطافرة مالم تطفر جميع الانوية دفعة واحدة وهذا احتمال بعيد التحقق لأسباب احصائية صرفة (Auerbach, 1976 ; Fincham et al.,1979). ولذا ستكون الانوية الطافرة ضمن غزل فطري متباين النوى تسود فيه الانوية غير الطافرة على الطافرة وتبدو المستعمرات برية المظهر بالنسبة للصفة المدروسة فتُفقَد الطافرات (Burnett, 1975).

الجدول 3: متوسط النسبة المئوية للكونيدات المقتولة من السلالة AA1 من الفطر *A.alternata* المعرضة لفترات مختلفة من اشعة UV.

فترة التشعيع (دقيقة)	شدة القتل			
	R1	R2	R3	المتوسط ± SE
10	0.76	0.78	0.69	0.27±0.74
15	0.83	0.80	0.79	0.012±0.81
20	0.88	0.90	0.93	0.021±0.91

SE: الخطأ القياسي Standard error

الطافرات المعزولة:

عزل نوعين من الطافرات هما الطافرات اللونية (البيضاء والتي أعطيت الرمز المرفولوجيW للون الكونيدات الابيض) وطافرات مقاومة للمادة السامة الكلورات وأعطيت الرمز Chl أو مقاومة للمادة السامة سلينات الصوديوم وأعطيت الرمز Sel مع إعطاء رقم تسلسلي مع كل رمز للإشارة إلى رقم العزلة. ابتداء

جرى عزل ثلاث طافرات لونية من السلالة البرية AA1 السوداء الكونيدات وذلك بتعريض مستعمرات نامية لمدة يومين على الوسط الصلب إلى أشعة UV بنفس الظروف الموصوفة لتشعيع الكونيدات و إعادة تحضينها لمدة يومين اضافيين فظهرت قطاعات بيضاء على ثلاث مستعمرات مختلفة وجرى عزل كونيدات من هذه القطاعات وتنقيتها بطريقة عزل السبور المنفرد على الوسط PDAD وأعطي لها الرموز SW1 و SW2 وSW3 على الترتيب. ثم استعملت هذه الطافرات مع السلالة البرية AA1 لعزل طافرات اخرى كما مبين في (الجدول 4). كما جرى عزل طافرات بيضاء اخرى بتشعيع كونيدات السلالة AA1 السوداء الكونيدات و ذلك كما موضح في (الجدول 4). فقد جرى عزل خمس طافرات تلقائية مقاومة للكلورات من السلالة الابوية AA1 وذلك بتلقيح عدة اطباق من الوسط الغذائي الانتقائي MD الحاوي على مادة الترترات وعلى مادة الكلورات بالتركيز السام للسلالة (Cove, 1976) كل منها بحوالي 10^6 كونيدة من عالق كونيدي غير مشعع وتحضين الاطباق لمدة تراوحت من 15 الى 20 يوما. اذ ظهرت هذه الطافرات على هيئة مستعمرات كبيرة وواضحة ضمن ارضية من النموات الضعيفة للكونيدات غير المقاومة. وجرت عملية تنقية لهذه المستعمرات بطريقة عزل السبور المنفرد وعلى الوسط الانتقائي نفسه الذي عزلت عليه. ثم جرت عملية اعادة زراعتها لعدة مرات على الوسط الانتقائي للتأكد من ثبات مقاومتها. بعد ذلك اعطيت الطافرات رموز المقاومـة للكلورات (Chl5-Chl9) (الجدول 4) وحفِظت على موائل من الوسط PDA الحاوي على الترترات. ويبدو ان التحضين الطويل على الوسط الانتقائي قد اعطى الفرصة الكافية للنوى الطافرة تلقائيا على التقاسم والتكاثر على حساب النوى غير الطافرة في الغزل الفطري الناشئ من الكونيدة المتعددة الخلايا والانوية مما ادى الى تَكُّون المستعمرات المقاومة التي امكن مشاهدتها وعزلها من على اطباق الوسط الانتقائي (Fincham *et al*., 1979). كما جرى عزل طافرة اخرى مقاومة للكلورات من السلالة الابوية AA1 وذلك من تلقيح عدة اطباق من الوسط الانتقائي الذي عزلت عليه الطفرات التلقائية المقاومة للكلورات كل بحوالي 10^6 كونيدة من عالق كونيدي مشعع باشعة UV وبعد تحضين لمدة 4-5 أيام نقيت المستعمرة بأسلوب عزل السبور المنفرد واعطيت الرقم Chl10 (الجدول 4) وحفظت على مائل من الوسط الذي حفظت عليه الطفرات التلقائية Chl5-Chl9 (الجدول 4). استعملت الطافرة Chl10 السوداء الكونيدت لحث طافرة بيضاء الكونيدات وذلك بتشعيع كونيداتها(السلالة Chl10) بواسطة اشعة UV وتلقيح عدة اطباق من الوسط PDAD مضافا اليها الترترات فقط، كل منها ملقح بحوالي 10^6 كونيدة مشععة والتحضين لمدة 4-5 ايام اذ ظهرت مستعمرة واحدة متميزة في لون كونيداتها الابيض فعزلت ونقيت واعطيت الرمز SW4 لتحمل المظهر المزدوج لون الكونيدات الابيض والمقاومة للكلورات (الجدول 4).

وبالطريقة نفسها التي عزلت فيها الطفرات التلقائية المقاومة للكلورات (Chl5-Chl9) من السـلالة الابويـة A1 فقد جرى عزل 15 طافرة تلقائية مقاومة للكلورات من السلالة البيضاء SW3. أُعطيت هذه الطـافرات الرموز Chl13-Chl27 (الجدول 4). وبالطريقة نفسها التي عزلت فيها الطافرة Chl10 المقاومة للكلـورات

من السلالة AA1 فقد جرى عزل خمس طافرات مقاومة للسلينات وذلك مـن تـشعيع كونيـدات الـسلالة البيضاء W2 والزرع على الوسط الانتقائي MD المعضد بالحامض الاميني D-methionine وبتركيز نهائي قدره 0.2 mM في وسط النمو والمحتوي على سلينات الصوديوم بتركيز نهائي فـي وسـط النمـو قـدره 280 mM (Arst, 1968). نُقيت الطافرات على نفس الوسط الانتقائي الذي عزلت عليه واعطيـت الارقـام Sel1-Sel5 (الجدول 4) وحفِظَت على موائـل مـن الوسـط PDA الحـاوي علـى الحـامض الامينـي D-methionine. وبذا بلغ عدد الطافراتالتي جرى عزلها من السلالة البريةAA1 الـسوداء الكونيـدات 31 طافرة بين طافرات لونية (بيض الكونيداتW) او طافرات مقاومة للكلـورات (Chl) او مقاومـة للـسلينات (Sel) او طافرات تجمع بين صفة اللون الابيض واحدى صفتي المقاومة. وكانـت جميـع الطـافرات ذات مورفولوجية طبيعية في شكل المستعمرة وانتاج الكونيدات ما عدا بعض الاختلافات في معدلات النمو وهـو امر طبيعي في الطافرات الفطرية (Burnett, 1975 ; Fincham *et al*., 1979).

ان عزل هذا العدد من الطافرات وباستعمال طرائق العزل الاعتيادية مثل اشعة UV يعد انجازا هاما فهذا الفطر صعب التعامل معه من الناحية التصنيفية (Simmons, 1992 ; Webster and Weber, 2007; Simmons, Personal communcation, 2011) ومن الناحية الوراثية تكون كونيداته متعددة الخلايا وبعضها متعددة الانوية (Honda,1990).

جرت محاولات سابقة لعزل بعض الطافرات الغذائية ولكن من خلال زراعة الكونيدات المعاملة بالمطفر الكيمياوي وانتخاب اطراف الهايفات واحدة واحدة للعثور على المستعمرات الطافرة مما حد من حجم العشيرة الممسوحة (Screened) الى بضع مئات (Tsuge *et al*.,1987) في حين امكن في العمل الحالي مسح الملايين من الكونيدات المعاملة او غير المعاملة (وخاصة بالنسبة للطافرات المقاومة) مما يزيد من احتمالية العثور على الطافرات وهذا بدوره يؤسس لدراسة هذا الفطر بالطرائق الوراثية القياسية (Formal genetic methods) وليس الاقتصار على استخدام اليات الهندسة الوراثية المكلفة والمعقدة والمحدودة الاستعمال لحالات محددة بذاتها كما جرى سابقا مع هذا الفطر (Kimura and Tsuge, 1993; Kawamura *et al*., 1999).

الجدول 4: الاشكال المظهرية (Phenotypes) للسلالات مع مصادرها.

المصدر	العدد	لون المستعمرة	السلالة ومظهرها
عزلة برية من أوراق نبات الباقلاء (الطائي,2007)	1	B	AA1
مستحثة بتشعيع مستعمرات AA1 بأشعة UV	1	W	SW1
مستحثة بتشعيع مستعمرات AA1 بأشعة UV	1	W	SW2
مستحثة بتشعيع مستعمرات AA1 بأشعة UV	1	W	SW3
تلقائية منكونيدات السلالةAA1	5	B	Chl5-Chl9
مستحثة بتشعيع كونيداتAA1 بأشعة UV	1	B	Chl10
مستحثة بتشعيع كونيداتChl10 بأشعة UV	1	W	SW4
مستحثة بتشعيع كونيداتSW1 بأشعة UV	1	W	Chl12
تلقائية من كونيدات السلالة SW3	15	W	Chl13-Ch27
مستحثة بتشعيع كونيدات SW2 بأشعة UV	5	W	Sel1-Sel5

B: لون المستعمرة اسود؛ W: لون المستعمرة ابيض ؛ SW: طافرة لونية بيضاء الكونيدات.

Chl: طافرة مظهرها مقاوم لكلورات البوتاسيوم ؛ Sel: طافرة ذات مظهر مقاوم لسلينات الصوديوم.

المصادر العربية

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

الطائي، ورقاء سعيد قاسم (2007). دراسة تصنيفية لانواع جنس *Alternaria* المسببة لمرض تبقع الاوراق وتهيئة موديل للسيطرة البايولوجية في مدينة الموصل، اطروحة دكتوراه، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

المصادر الأجنبية

Arst, H.N. (1968). Genetic analysis of the first steps of sulphate metabolism in *Aspergillus nidulans*. *Nature*, **219**, 268-270.

Auerbach, C. (1976). "Mutation Research". Chapman and Hall, London. pp.173-202.

Barkai-Golan, R. (2008). "Mycotoxins in Fruits and Vegetables". Elsevier, pp. 185-191.

Burnett, J. H. (1975). "Mycogenetics". Wiley, London. pp. 25-46.

Burnett, J. H.(2003). "Fungal Populations and Species". Oxford University Press, London. pp. 65-79.

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

Cove, D. J. (1976). Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*.the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity*, **36**, 191-203.

Fincham, J. R.S.; Day, P.R. ; Radford, A. (1979). "Fungal Genetics". Blackwell, Oxford. pp. 51-72.

Honda, Y.; Nanba, N. ; Nozu, M. (1990). A further study on ultrastructural aspects of photo-induced conidiogenesis and differentiation in *Alternaria solani, Bull. Fac. Agr.,* **24**, 39 - 46.

Huang, S.L.; Kohmoto, K.; Otani, H. ; Kodama, M. (1996). Nuclear behavior during the formation ofapressoriaby *Alternaria alternata. Myco. Sci.,* **37**, 41-47.

Jacobson, E.S. (2000). Pathogenicroles for fungal melanins*. Clin. Microbiol. Rev.,* **13**, 708-717.

Kimura, N. ; Tsuge, T. (1993). Genecluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata. J. Bacteriol.,* **175**, 4427-4435.

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

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

Russell, P. J. (2010). "Genetics". Benjamin, San Francisco. pp. 130-169.

Simmons, E.G. (1992). Alternaria taxonomy , current status, viewpoints and challenges. in : I. Chelkowski and A. Visconti (eds.) Alternaria: Biology, Plant Diseasesand Metabolites . Elsevier, Amsterdam, pp.1-35

Stuart, R.M.; Bastianel, M.; Azevedo, F. ;Machado, M.A. (2009). Alternaria brown spot disease .*Laranja*, *Cordeirópolis*, **30**:29-44.

Thomma, B.P.H.J. (2003). *Alternaria* spp.*:* from general saprophyte to specific parasite. *Mol. Plant Pathol.,***4**, 225-236.

Tsuge, T.; Hayashi, N. ; Nishimura, S. (1987). Selection ofauxotrophic mutants and heterokaryosis in *Alternaria alternata* . *Annu*. *Phytopathol*. *Soc*. *Japan*, **53**, 182-190

Webster, J. ; Weber, R.W.S. (2007). "Introduction to Fungi". 3rd edn. Cambridge University Press , Cambridge . pp. 459-486.

Zapatero, L.; Martíez-Can" vate, A.; Lucas, J.M.; Guallar, I.; Torres, J.; Guardia, P.; Torre, F.L. ; Pedemonte, C. (2011). Clinicalevaluation of patient with respiratory allergic disease due to sensitisation to *Alternaria alternate* being treated with subcutaneous immune therapy. *Allergol . Immunopathol. (Madr).* **39**, 79-84.