---مجلة علوم الرافدين، المجلد 27، العدد 4 / عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثالث لعلوم الحياة، ص 232-242، 2018---

تكوين متباين النوى من طافرات لونية وغذائية مقاومة للكلورات والسلينات في الفطر *Alternaria alternate*

هدى وليد هادي   **ساهي جواد ضاحي**

قسم علوم حياة /كلية العلوم/جامعة الموصل

E-mail:merrymathiew@yahoo.com

(أُستلم 20/ 6 /2018 ؛ قُبل 1 / 11/2018)

الملخص

أخذ البحث على عاتقه مقارنة تكرار الطافرات المقاومة لكل من الكلورات و السلينيات، اذ وجد ان تكرار الطافرات المستحثة بالأشعة فوق البنفسجية هي اعلى بكثير من تكرار طافراتها التلقائية لكلتا المادتين، فقد كان تكرار الطافرات المقاومة للكلورات المعزولة من سلالتين ابويتين مختلفتين هما AA_1 و SW_3 والمستحثة اعلى في حدود27 و23 مرة على التوالي من التكرارات التلقائية، اما السلينيات فقد كانت الطافرات المستحثة والمعزولة من سلالتين ابويتين مختلفتين ايضا هما AA_1 و SW_2 اعلى في حدود 5 و8 مرات من تكرارتها التلقائية وعلى التوالي ايضا. اما السلالات الطافرة (Chl_5-Chl_9) و(Chl_{13}-Chl_{27}) جميعها كانت مقاومة للكلورات ذات عوز غذائي للنترات لكنها توزعت بين تلقائية ومستحثة وكذلك بين بيضاء الكونيدات او سوداء الكونيدات، اما الطافرات Sel1-Sel5 المقاومة للسلينيات فهي طافرات لونية (بيضاء الكونيدات) وغذائية في الوقت نفسه، اي ذات عوز غذائي للكبريتات. كما تم تكوين متباين النوى في الفطر *Alternaria alternata* بين السلالتين Chl_{10} السوداء الكونيدات ذات العوز الغذائي للنترات nit ذات التركيب الجيني (nit_{10},w_{2+},s_{2+}) والسلالة Sel_2 البيضاء الكونيدات ذات العوز الغذائي للكبريت s_2 ذات التركيب الجيني (nit_{10+},w_2s_2)، إذ يمثل متباين النوى النواة الاولية في بداية اجراء التحليلات شبه الجنسية في هذا الفطر الممرض النباتي.

الكلمات الدالة: متباين النوى، طافرات غذائية للنترات، طافرات غذائية للكبريتات، *Alternaria alternata* .

Heterokaryon Formation from Color and Nutrient Mutants Resistant to Chlorate and Selenite in Fungus *Alternaria alternate*

Huda W. Hadi   **Sahi J. Dhahi**

Department of Biology/College of Science/University of Mosul

ABSTRACT

The frequency of spontaneous mutants resistant to both chlorate and selenite was compared with the frequency of mutations induced by ultraviolet rays. The results showed that, the frequencies of chlorate resistance strains which isolated from two different parenting strains, AA_1 and SW_1, were higher than 27 and 23 times from spontaneous frequencies respectively, so as for selenite resistant results, the induced and isolating mutants of two different parenting strains, AA_1 and SW_3, were about 5 and 8 times higher than their spontaneous frequency, respectively. The mutant strains (Chl_5-Ch_{l9}) and (Chl_{13}-Chl_{27}) were all resistant to chlorate-nitrate auxotrophic but they were distributed between spontaneous and induced as well as white or black conidia, while the mutants sel_1-sel_5 resistance to the selenite are color mutants (white conidia) and sulfates auxotrophic at the same time. Heterokaryon was also formed in *Alternaria alternata* between the two black Chl_{10} strains, nitrate auxotrophic, have the genotype (nit_{10}, w_{2+}, s_{2+}) and the white Sel2

strain, have the genotype (*nit₁₀* +, *w₂s₂*) which represent important Preliminary event at the beginning of a para-sexual analysis in this plant pathogen fungus

Keyword: Heterokaryon, nitrate auxotrophic, sulfate auxotrophic, *Alternaria alternate.*

المقدمة

يعود جنس الألترناريا إلى قسم الفطريات الناقصة Fungi Imperfecti (Deuteromycotina) وهي الفطريات التي لم يُشاهد فيها التكاثر الجنسي إما لعدم وجودهِ أصلا أو لعدم اكتشافه بعد. فهو يضم حشداً من الأنواع المختلفة المنتشرة حول العالم والمتواجدة في مختلف البيئات، والعديد من هذه الأنواع هي ممرضات نباتية انتهازية (Opportunistic)، ولاسيما في فترة ما بعد الحصاد، ومن خلال إنتاج السموم الفطرية Mycotoxins تحدث مجموعة من الأمراض على العديد من النباتات المهمة اقتصادياً كالنجليليات والمحاصيل النباتية ونباتات الزينة، والخضراوات كالبطاطا والقرنابيط والجزر، وعلى الأثمار كالطماطة والحمضيات والتفاح (Rotem, 1994;Thomma, 2003; Agrios, 2005) والى تلوث الطعام والمغذيات.

وفي ضوء العديد من الأمراض التي تحدثها فطريات هذا الجنس في العديد من المحاصيل النباتية المهمة اقتصادياً والدور الذي تؤديه كل من السموم المتخصصة والانزيمات والميلانين في أمراضية هذه المجموعة فقد صارت أنواعها مادة للعديد من الدراسات التي تناولت انتشارها وتصنيفها وبيولوجيتها وعددٍ من الجوانب الوراثية المتعلقة بإنتاجيتها للسموم والميلانين وعلاقة ذلك بإمراضيتها (Simmons, 1992؛ الطائي،2007).

ومن هذا المنطلق يهدف البحث الحالي إلى إجراء دراسة وراثية تتناول إنتاج الميلانين في الفطر *Alternaria alternata* ومقاومة الكلورات والسلينات وتسخير هذه الطافرات لبناء متباين النوى الذي يعد الحدث التمهيدي الاساسي لدراسة الدورة شبه الجنسية في الفطر. كبداية للدراسات الفسلجية والكيموحيوية لإنتاج هذه الصبغة وربط ذلك بامراضية الفطر أو ديمومته (Survival). وعلى الرغم من أن عدداً من الدراسات الوراثية قد أجريت سابقاً إلا أنها اعتمدت على تقنيات الهندسة الوراثية كلونة الجينات (Kimura and Tsuge, 1993; Tanabe *et al*., 1995; Takano *et al*., 1997) مما يؤسس طريقة وراثية قياسية مباشرة لعزل الطافرات على نطاق واسع وإجراء التضريبات بيسر من اجل الوصول إلى رسم الخارطة الوراثية للفطر وهو ما نحاول الوصول إليه في هذا البحث.

المواد وطرائق العمل

الكائن الاختباري:

استعملت في هذا البحث عدد من عزلات الفطر *Alternaria alternata* ، وتعد العزلة AA_1 عزلة برية في احتياجاتها الغذائية وذات كونيدات سود جرى عزلها من مرض تبقع الأوراق لنبات الباقلاء في محافظة نينوىِ /العراق (الطائي،2007) اما بقية العزلات فهي طافرات مستحثة.

الأوساط الزرعية وظروف الزرع:

استعمل وسط البطاطا-دكستروز أكار(Potato-Dextrose Agar) بغية إحداث نمو سريع للفطر وتكوين كمية كبيرة من الكونيدات و يرمز له اختصاراً PDA (Pitt and Hocking, 2009) كما جرى استعمال وسط البطاطا سكروز-أكار Agar Potato-Sucrose ويرمز له PSA وهو الوسط الأول نفسه من حيث التحضير والكمية عدا انه أُستعيض عن الدكستروز بالسكروز المتوفرة. واستعمل وسط الحد الأدنى (Minimal Medium) ويرمز له (M)، المعتمد في الدراسات الوراثية المتبعة مع الفطر *Aspergillus amstelodomi* والفطر *Aspergillus nidulans*، مع مراعاة ان كمية السكروز كانت 20gm/L للفطر *Alternaria* (Caten, 1979). اما محلول ملح Sodium deoxycholate (D) فاستعمل

للحد من نمو الفطر لتكوين مستعمرات صغيرة محددة ومنفصلة عن بعضها عند الحاجة لذلك (Mackintosh and Pritchard, 1963; Caten,1979 ; ضاحي وهادي،2012).

دراسة الطافرات الغذائية:

بالنظر الى كون كونيدات هذا الفطر متعددة الخلايا فإنه يصعب الحصول على طافرات غذائية من خلال زرع الكونيدات على الوسط الكامل التعضيد مثل PSAD، ومن ثم نقل المستعمرات النامية بطريقة التكرار بالختم (Replica plating)(Lederberg and Lederberg, 1952) على الوسط غير المعضد أو الوسط الأدنى، إذ إن ذلك يتطلب أن تكون جميع خلايا الكونيدة الواحدة قد طفرت من النمط البري (Wild type) إلى حالة العوز الغذائي (Auxotrophy)، لان الصفة الطافرة على الأغلب متنحية (Auerbach, 1976). ولامر احصائي صرف فان احتمال طفور عدة خلايا باتجاه واحد هو احتمال بعيد جداً لذا لا بد من وجود طريقة انتخاب أوتوماتيكي (Automatic Selection) لعزل الكونيدة الطافرة بالكامل من النمط البري إلى النمط الغذائي (Auxotrophy) وذلك من خلال قتل الكونيدات غير الطافرة وإبقاء الكونيدات الطافرة. ويتوفر هذا النمط من الانتخاب في الطفرات المقاومة للعقاقير السامة (Drug resistant mutants) وكذلك في الحالات التي تمثل انتخاباً باتجاهين متعاكسين (Two-way selection) وهي الحالات التي تكون فيها المقاومة انعكاساً لحاجة غذائية، إذ ننتخب أو نعزل الطفرة الأمامية (Forward mutation) على أنها طفرة مقاومة لأحد الكيمياويات ولكنها في الحقيقة هي تمثل حاجة غذائية لذلك يمكن الافادة منها والتعامل معها على انها غذائية (Auxotrophy) (Fincham *et al*., 1979) الى هذا النمط الأخير تعود الطفرات المقاومة لكلورات البوتاسيوم ($KClO_3$) والطفرات المقاومة لسلينات الصوديوم (Na_2SeO_4) في الفطر *A. nidulans* وفيما يأتي توضيح لذلك

ا- **الطافرات المقاومة لكلورات البوتاسيوم:** تعد الكلورات (ClO^-_3) نظيراً للنترات (NO^-_3) يمكن أن تدخل مسار ايض النترات فتسممه ويموت الفطر بسبب العوز لعنصر النايتروجين. وعليه فإن العديد من الطفرات في مسار ايض النترات تكون غير قادرة على تأييض النظير السام (الكلورات) ولذلك وتظهر هذه الطفرات مقاومة للكلورات وتنمو بوجودها شريطة أن توفر للفطر في وسط النمو مصدراً بديلاً للنايتروجين له مسار مستقل للدخول والتأييض عن مسار النترات المعطوب من جراء الطفرة. وهذه الطفرات ليس بمقدورها النمو في الوسط الخالي من الكلورات أيضا ما لم تزود بمصدر للنايتروجين غير النترات أي تصبح طفرات ذات عوز غذائي لإحدى مصادر النايتروجين وهذا ماإعتمده (Cove, 1976, a,b) واعتمد على (ضاحي وهادي، 2012) في دراستها.

ب- **الطافرات المقاومة للسلينات:** تعد السلينات (SeO_4) نظيراً للكبريتات (SO_4^{-2}) وهو نظير سام للبكتيريا والفطريات (Pasternak, 1962) وتبين أن تسميته متأتية من تعارضه مع أيض الكبريتات إذ لوحظ أن السلينات تسلك الطريق نفسه الذي تسلكه الكبريتات في أثناء دخولها الخلية الحية، وتسلك (السلينات) سلوك مادة أساس للعديد من انزيمات ايض الكبريتات مما ينتج عن ذلك مركبات سلينية تحل محل الكبريت مما يؤدي الى تسمم الكائن (Thomposn, 1967) ولاحظ Arst (1968) أن معظم الطافرات المقاومة للسلينات في الفطر *A. nidulans* هي طافرات ذات حاجة غذائية إلى الكبريت الذي يجب توفيره بصورة بديلة عن (SO_4^{-2}) في مسار دخوله ومسار أيضه عن الكبريتات ولذلك فإن عزل الطافرات المقاومة للسلينات هي طافرات غذائية ذات عوز غذائي يمكن تعويضه بمصدر نايتروجين آخر مثل حامض الميثايونين (Methionine). كما جاء في (Arst ,1968 ; ضاحي وهادي،2012).

ج- **بناء متباين النوى :** متباين النوى (Heterokaryon) هو غزل يحتوي أكثر من نوع واحد من النوى المختلفة وراثياً ويمكن ان ينشأ من جراء تلاقي الهايفات النامية لمكونية وذوبان الجدر الخلوية النووية بينهما، واندماج السايتوبلازمين والنوى لكلا المكونين في هايفة واحدة والتي بدورها تستمر في النمو والتفرع. (Carlile *et al*., 2001). ولكي يحصل الاندماج بين

سلالتين مختلفتين فيجب أن يكون الغزلان متوافقين خضرياً أي متماثلين بالنسبة لاليلات جين أو جينات التوافق الخضري (Vegetative (heterokaryon) incompatibility) (Moore and Frazer, 2002). وجرى تحضير أو بناء متباين النوى بين الطافرات المختلفة وذلك حسب (ضاحي ومحمود، 2008).

النتائج والمناقشة

نمو السلالة الأبوية AA_1 على الاوساط الزرعية:

على الرغم من أن السلالة الأبوية AA_1 للفطر *Alternaria alternata* كانت قد عزلت أصلاً من مرض تبقع الأوراق على نبات الباقلاء فإنها أعطت نمواً جيداً من حيث تكوين الغزل الفطري وإنتاج الكونيدات على الأوساط الزرعية المختبرية مثل الوسط PDA و PSA. كما أظهرت السلالة AA_1 قدرة على النمو في الوسط الأدنى (M) Minimal وهو الوسط الأدنى نفسه المستعمل في تنمية الفطر *Aspergillus amstelodami* باستثناء أن نسبة السكر هنا هي 2% مقارنة بنسبة 20% المستعملة مع الفطر *A. amstelodami* وذلك لكون الأخير فطر يحبذ التراكيز الازموزية العالية (Osmophylic) (Caten,1979). وهذا يمكن من إجراء الاختبارات الكيمياوية الدقيقة كالاستجابة للمواد الغذائية أو المواد السامة لدى السلالة AA_1 ومشتقاتها ويمهّد لإجراء الدراسات الوراثية. كذلك استجابة السلالة AA_1 للملح Sodium deoxycholate (D) المحدِّدة للنمو الخضري وإعطاء مستعمرات منفردة ومحددة (Discrete) عند زرع كونيدات الفطر *A. nidulans* (Mackintosh and Pritchard, 1963) والفطر *A.amstelodami* (Caten, 1979) مما يسهل عَدَّ بضع مئات من المستعمرات الفطرية على الطبق الواحد. وهذا ضروري لإجراء الدراسات الوراثية في الفطر ، إذ يتطلب الامر مسح الآف من المستعمرات في التجربة الواحدة. واستجابة الفطر *A. alternata* لهذا الملح يجعل التعامل معه في الدراسات الوراثية ممكناً. وقد وجد أن تركيز D المناسب للفطر *A.alternata* هو 400 مايكرو غرام/مل من وسط النمو. وهذا يماثل التركيز المستعمل مع الفطر *A.amstelodami* (Caten, 1979) ولكنه نصف التركيز المستعمل مع الفطر *A. nidulans* (Mackintosh and Pritchard,1963). فالتركيز المناسب لكل فطر من هذا الملح يختلف باختلاف الفطر ويجب أن يُحدد بالتجربة فضلا عن الخصائص المزرعية.

الطافرات الغذائية:

بعد تحديد المعاملة بأشعة UV التي تقتل في حدود الـ 90% من الكونيدات المعاملة والتراكيز الدنيا من كلورات البوتاسيوم القاتلة للسلالات المختلفة من الفطر (ضاحي وهادي،2012) فقد جرت محاولات عدة لعزل طافرات مقاومة لكلورات البوتاسيوم من السلالات المختلفة. ويظهر (الجدول 1) إحدى هذه التجارب لعزل مثل هذه الطافرات من السلالة البرية AA_1 السوداء وطافرتها اللونية البيضاء SW_3. إذ يلاحظ من الجدول أن متوسط تكرار الطافرات المقاومة للكلورات المستحثة في كونيدات السلالة AA_1 السوداء هو في حدود 27 مرة مقارنة بمتوسطها التلقائي (27×10^{-5}مقابل 1×10^{-5}) على الترتيب. وكانت المقارنة مماثلة لذلك تقريباً بالنسبة لمتوسطي تكرار الطافرات المقاومة للكلورات من كونيدات السلالة SW3 البيضاء إذ بلغت المقارنة 25,5 مرة (23×10^{-5} للمستحثة مقابل0.9×10^{-5} للتلقائية) (الجدول 1). وهذا متوقع فأشعة UV عند الطول الموجي من 250–260 هي عامل مطفر للمادة الوراثية في الكائنات الحية جميعها(Drake, 1970, Auerbach, 1976) وبهذه الطريقة جرى عزل العديد من الطافرات المقاومة لكلورات البوتاسيوم في السلالة الأبوية AA_1 وعدة سلالات أخرى مشتقة منها. ولما كان الشكل المظهري الذي عزلت على أساسه الطافرات هو المقاومة للكلورات فقد أعطيت كل منها الرمز المبدئي Chl ورقم صغير إلى جانبه يمثل رقمها التسلسلي في العزل بين هذا النوع من الطافرات. كذلك اختبرت قدرتها على النمو في الوسط الأدنى M وكذلك على الوسط الأدنى مضافاً إليه ترترات الامونيوم كمصدر للنايتروجين. وبذا تم عزل الطافرات المقاومة للكلورات من

Chl_{27}-Chl_5 (إذ أهملت الطافرات Chl_4-Chl_1 لضعف نموها على وسط الكلورات). ويظهر (الجدول 3) ملخصاً لخصائص الطافرات Chl_{27}-Chl_5.

وبطريقة مماثلة جرى تقدير متوسط الطافرات المقاومة للمادة السامة سلينات الصوديوم في السلالة الأبوية AA_1 السوداء الكونيدات وطافرتها البيضاء الكونيدات SW_2. فكان تكرار الطافرات المقاومة للسلينات المستحثة في كونيدات السلالة الأبوية AA_1 السوداء الكونيدات هو 5×10^{-5} مقارنة بالكونيدات غير المشععة، إذ لم يعثر على طافرة واحدة ضمن عشيرة ممسوحة من المستعمرات النامية حجمها سوى 165×10^{3} كونيدة، أي أن تكرار الطافرات التلقائية هو اقل من 1 في 16000 أي اقل من 0.6×10^{-5} وبذلك يكون تكرار الطافرات المستحثة اكبر من 0.6/5 أي اكبر من 8.3 مرة (الجدول 2). والشيء نفسه عن تكرار الطافرات المقاومة للسلينات التلقائية أو المستحثة في كونيدات السلالة البيضاء sw_2 إذ بلغ تكرار المستحثة 8×10^{-5}فيما لم يعثر على طافرة واحدة مقاومة من بين 172×10^{3} كونيدة غير مشععة (المعاملة 0) وبذا يكون تكرار الطافرات تلقائية المقاومة للسلينات في كونيدات السلالة SW_2 اقل من 1 في 172×10^{3} أي اقل من 5×10^{-5} بمعنى أن تكرار المستحثات هو $5\times10^{-5}/8\times10^{-5}$ويساوي 16 مرة بقدر التلقائية كما في (الجدول 2) إذ يلاحظ أن تكرار الطافرات المقاومة للكلورات سواءً التلقائية أم المستحثة (الجدول 1) كان اكبر من نظيراتها المقاومة للسلينات (الجدول 2).

الجدول1: تكرار الطافرات المقاومة لكلورات البوتاسيوم بين الكونيدات الناجية من السلالة الأبوية السوداء الكونيدات AA_1 او السلالة البيضاء SW_3 بعد معاملة عوالقهما الكونيدية أشعة UV لمدة 20 دقيقة وعلى بعد 10 سم

السلالة	المعاملة	حجم العشيرة الممسوحة المقدر	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
AA1	0	95000	1	$10^{-5}\times1$
	UV	11000	3	$10^{-5}\times27$
SW3	0	102000	1	$10^{-5}\times0.9$
	UV	13000	3	$10^{-5}\times23$

0 : بلا تشعيع ومتوسطها يمثل المتوسط التلقائي

UV : المعاملة بأشعة UV

ظروف التشعيع كما جاء (ضاحي وهادي،2012)

الجدول 2: تكرار الطافرات المقاومة لسلينات الصوديوم (Na_2SeO_4) بين الكونيدات الناجية من السلالة الأبوية السوداء الكونيدات او السلالة SW_2 البيضاء الكونيدات بعد معاملة عوالقهما بأشعة UV لمدة 20 دقيقة وعلى بعد 10 سم

السلالة	المعاملة	حجم العشيرة الممسوحة المقدر	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
AA_1	0	165000	0	$10^{-5}\times0.6$>
	UV	20000	1	$10^{-5}\times5$
SW_2	0	172000	0	$10^{-5}\times0.5$>
	UV	25000	2	$10^{-5}\times8$

ظروف التشعيع كما جاء في (ضاحي وهادي،2012)

وهـذا أمـر وارد إذ أن جيناتهـا المختلفـة لهـا معـدلات طفـور مختلفـة (Drake, 1970; Auerbach, 1976; Fincham *et al.*, 1979) وبهذه الطريقة أمكن عزل خمس طـافرات مستحثة بأشـعة UV في كونيدات السـلالة البيضـاء sw_2. ولما كانت هذه الطـافرات معزولـة علـى اساس مظهرها (Phenotype) المقاوم للسلينات فقد أُعطي كل منها الرمز المبدئي Sel وأُضيف لرمز كل منها رقماً يمثل تسلسل عزلها لتصبح الطافرات Sel_5-Sel_1 (الجدول 3). وقد جرت تنقيتها بإسلوب عزل السبور المنفرد (Single spore isolation) وجرى اختبـار قدرتها فـي النمو علـى الوسط M والوسط M+D-meth والوسط M+D-meth+Selenate (الجدول 3).

ويظهر (الجدول 3) مُجمل الصفات المظهرية (Phenotypes) للسلالات الأبوية والطـافرات المختلفة التـي جرى عزلها من السلالة الأبوية AA_1 أو إحدى مشتقاتها وطريقة الحصول على هذه السلالات.

الجدول 3: الخواص العامة للطافرات التي جرى عزلها ودراستها

السلالة الأبوية	المعاملة	السلالة الطافرة	لون الكونيدات	M+كلورات+ترترات	M+سلينات+ D-meth	M	M+ترترات	M+ D-meth
AA1			B	−	−	+	+	+
	UV	SW1	W	−	−	+	+	+
	UV	SW2	W	−	−	+	+	+
	UV	SW3	W	−	−	+	+	+
	0	Chl_5-Chl_9	B	+	−	−	+	−
	UV	Chl_{10}	B	+	−	−	+	−
Chl_{10}								
	UV	Chl_{11}	W	+	−	−	+	−
SW_1								
	UV	Chl_{12}	W	+	−	−	+	−
SW_3	0							
		Chl_{27}-Chl_{13}	W	+	−	−	+	−
SW_2								
	UV	Sel_5-Sel_1	W	−	+	−	−	+

0: بدون معاملة ؛ UV: المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية ؛ B: لون المستعمرة اسود ؛ W: لون المستعمر ابيض.

Chl: المظهر مقاوم للكلورات ؛ Sel: المظهر مقاوم للسلينات.

كلورات : 100mM $KClO_3$ ؛ ترترات: ترترات الامونيوم (5mM) ؛ سلينيات: 300mM Na_2SeO_4 ؛ D-meth: 0.2mM D-methionin.

+ : نمو ؛ − : عدم نمو

الطافرات المعزولة بدون معاملة (0) جرى عزلها بعد زرع كونيدات السلالة الأبوية وتحضينها على وسط العزل مدة تقرب من 15–20 يوماً.

ولما كان الهدف من عزل الطـافرات المقاومـة هو ليست المقاومـة بحد ذاتهـا، بل الإفادة من وجهها الآخر وهو العوز الغذائي (Auxotrophy) الذي تمثلـه كل طفرة غذائية لذا جرى التأكيد على هذا الجانب في كـلا نوعي الطفرات المقاومـة. ففي حالة الطفرات المقاومة لكلورات البوتاسيوم (Chl) فان مظهرها هذا يمثل حاجة غذائية للنايتروجين عدا النترات (NO_3^-) (Cove, 1976, a, b) لذا جرى اختبار نمو الطفرات Chl على الوسط الأدنى M وعلى الوسط M المعضد بترترات الأمونيوم بوصفه مصدراً نايتروجياً بديلاً عن النترات (NO_3^-). ولما أظهرت الطافرات استجابة سالبة على الوسط M الحاوي للنترات مصدراً وحيداً للنايتروجين فيما أعطت نمواً موجباً حينما جرى تعزيز الوسط M بترترات الامونيوم فضـلاً عن النترات فقد مثلت هذه الطـافرات عوزاً للنايتروجين.

تسمية الجينات:

ولما كانت الطفرة في أكثر من جين واحد على مسار اخذ النترات من الخارج إلى داخل الخلية ومن ثم أيض النترات إلى مرحلة الامونيوم داخل الخلية، تؤدي إلى عوز غذائي للنايتروجين (Cove, 1976, a, b) ولما لم تجر تحليلات كافية في البحث الحالي لتحديد أي من هذه الجينات يُعدّ طفرة ودعت الحاجة الغذائية للنايتروجين لذا أعطيت جميع الطافرات Chl الرمز الجيني (Genotype) المبدئي العام *nit* متبوعاً برقم يمثل تسلسل عزل الطفرة وذلك تمشياً مع نظام تسمية الجينات في الفطريات والفطر *Aspergillu nidulans* المقترح من قبل (Clutterbuck (1974، دون معرفة ما إذا كان التركيب الجيني *nit* يمثل جيناً واحداً أو أكثر من جين واحد (الجدول 4). والشئ نفسه يقال عن الطافرات المقاومة للسلينات (Sel) فهي في غالبيتها في الفطر *A. nidulans* تمثل عوزاً غذائياً للكبريت فيما عدا الكبريتات (SO_4^{-2}) وأعطيت الرمز الجيني *s* الذي يوجد منه عدة جينات مختلفة عبر مسار ايض الكبريتات ابتداءً من دخولها من خارج الخلية إلى داخلها ومن ثم ايضها الاحماض الامينية الحاوية للكبريت مثل السستايين (Cysteine) والميثايونين (Methionine) (Arst, 1968). وتمشياً مع تسمية هذا النوع من الطفرات في *A. nidulans* فقد أعطي للطافرات الخمس Sel_5-Sel_1 الرمز الجيني s_5-s_1 (الجدول 4) دون معرفة ما إذا كانت هذه الطفرات الخمس s_5-s_1 تمثل جيناً واحداً أو عدة جينات من خلال مسار ايض الكبريتات (SO_4^{-2}) وذلك لعدم إجراء تحليلات وراثية كافية في البحث الحالي للبت في هذا الأمر. وتماشياً مع الرموز الجينية المستعملة للطفرات اللونية (لون الكونيدات) في الفطر *A nidulans*. (Clutterbuck, 1974) والفطر *Aspergillus amstelodami* (Caten, 1979) إذ استعمل الرمز الجيني w^+ إشارة إلى الجين الذي عند طفوره إلى *w* في كلا النوعين فإنه يحيل اللون الأخضر للكونيدات (والمستعمرة) إلى اللون الأبيض (W) فقد استعمل الرمز نفسه w^+ في البحث الحالي للإشارة إلى الجين الذي يعطي الميلانين واللون الأسود (B) في الفطر *Alternaria alternata* والذي عند طفوره إلى *w* فإنه يوقف إنتاج الميلانين ويحيل لون المستعمرة (الهايفات والكونيدات) الأسود (B) إلى اللون الأبيض (W) (الجدول 4). وكانت دراسة هذه المجموعة من الطفرات (*w*) تبعاً لسلوكها الوراثي تمثل جانباً هاماً من البحث التالي لمعرفة الجينات المؤشرة من مسار بناء الميلانين في هذا الفطر.

الجدول 4: الاشكال المظهرية (Phenotypes) والتراكيب الجينية (Genotypes) المبدئية للسلالات مع مصادرها عن (ضاحي وهادي،2012)

السلالة ومظهرها	لون المستعمرة	التركيب الجيني	العدد	المصدر
AA_1	B	*w.t*	1	عزلة برية من أوراق نبات الباقلاء (الطائي، 2007)
SW_1	W	w_1	1	مستحثة بتشعيع مستعمرات AA_1 بأشعة UV
SW_2	W	w_2	1	مستحثة بتشعيع مستعمرات AA_1 بأشعة UV
SW_3	W	w_3	1	مستحثة بتشعيع مستعمرات AA_1 بأشعة UV
Chl_9-Chl_5	B	nit_9-nit_5	5	تلقائية
Chl_{10}	B	nit_{10}	1	مستحثة بتشعيع كونيدات AA_1 بأشعة UV
Chl_{11}	W	$nit_{10}\ w_{11}$	1	مستحثة بتشعيع كونيدات Chl_{10} بأشعة UV
Chl_{12}	W	$nit_{12}\ w_1$	1	مستحثة بتشعيع كونيدات SW_1 بأشعة UV
Chl_{27}-Ch_{13}	W	w_3nit_{27}-w_3nit_{13}	15	تلقائية
Sel_5-Sel_1	W	w_2s_5-w_2s_1	5	مستحثة بتشعيع كونيدات SW_2 بأشعة UV

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.

w: الرمز الجيني للطفرة البيضاء الكونيدات.

nit: الرمز الجيني لعدم القدرة على الاستفادة من النترات($NO3^-$) مصدراً وحيداً للنتيروجين في وسط النمو (أي ذات عوز غذائي للنايتروجين عدا النترات).

s: الرمز الجيني لعدم القدرة على الاستفادة من الكبريتات (SO_4^-) مصدراً وحيداً للكبريت في وسط النمو (أي ذات عوز غذائي للكبريت عدا الكبريتات)

التحليلات الوراثية : بما أن الفطر هو فطر ناقص لم تتضح فيه الدورة الجنسية فقد تركزت التحليلات الوراثية على التحليلات شبه الجنسية ومحاولة إيضاح الخطوات الأساسية للدورة شبه الجنسية كما جرى وصفها أساساً للفطر *A. nidulans* والتي تتضمن تكوين متباين النوى (heterokaryosis) والاندماج النووي بين عدد من أنويته لتكوين نواة مضاعفة المجموعة الكروموسومية خليطة (Heterozygousdiploid) (Pontecorvo *et al.*, 1953; Clutterbuck, 1974) وذلك بهدف ترسيخ طريق وراثي واضح لدراسة السيطرة الوراثية على مسار إنتاج الميلانين بوصفه احد مسارات الايض الثانوي الذي قد يؤدي دوراً هاماً في نمو الفطر ونضج كونيداته (Conidial development) وعيوشة (Survival) الفطر وأمراضيته (Pathogenicity) (Rotem, 1994; Thomma, 2003). وقد استعملت لهذا الغرض السلالات المبينة تفاصيلها في (الجدول 5).

الجدول 5 : خصائص سلالات *A. alternata* ومصادرها التي استعملت في التحليلات شبه الجنسية (Parasexual Analysis) في البحث الحالي

السلالة	التركيب الجيني	لون الكونيدات	النمو على الوسط الأدنىM	المصدر
AA_1 *	*w.t.*	B	+	عزلة برية من أوراق الباقلاء
SW_2	w_2	W	+	قطاع ابيض من مستعمرة AA_1 المشععة
Chl_{10}	nit_{10}	B	−	عزلة مقاومة لكلورات البوتاسيوم من كونيدات AA_1المشععة
Chl_{11}	nit_{10},w_{11}	W	−	عزلة بيضاء من كونيداتChl_{10} المشععة
Sel_2	$s_2\ w_2$	W	−	عزلة مقاومة لسلينات الصوديوم من كونيدات sw_2المشععة

w: طفرة تحيل لون الكونيدات الأسود (B) إلى الأبيض (W).

nit: طفرة تجعل الفرد مقاوماً لكلورات البوتاسيوم (Chl) وفي الوقت نفسه تحدث فيه عوزاً غذائياً لمصدر نيتروجيني غيرالال النترات (NO_3^-).

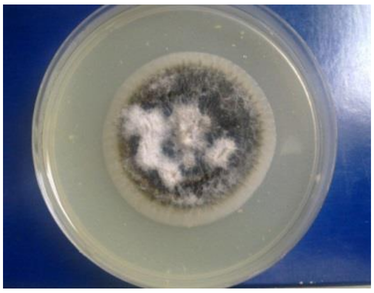
s: طفرة تجعل الفرد مقاوماً لسلينات الصوديوم (Sel) وفي الوقت نفسه تحدث فيه عوزاً غذائياً لمصدر كبريتي غير الكبريتات اللاعضوية (SO_4^{-2}).

* جميع السلالات الباقية جرى حثها في البحث الحالي كما مبين في الجدول. وكانت ظروف التشعيع بأشعة UV كما جرى وصفه في (المواد وطرائق العمل)

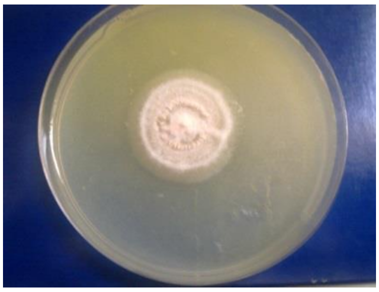
تكوين متباين النوى :

لقد تم تكوين متباين النوى بين كثير من السلالات الطافرة ولكنه لم ينجح الا بين السلالتين Chl_{10} وSel_2 وربما يرجع ذلك الى عدم توفر صفة التوافق الخضري (Moore and Frazer, 2002) في السلالات غير القادرة على تكوين متباين النوى على عكس السلالتين اللتين نجحتا في تكوين المتباين (الشكل 2) وخلال فترة قياسية قدرها اربعة ايام ،اذ كانت هاتان السلالتان تحملان نوعين من العلائم الوراثية: أولهما علائم وراثية لونية، إذ كانت السلالة Chl_{10} ذات كونيدات سوداء اللون (الشكل 1−أ) في حين

ان السلالة Sel_2 كانت بيضاء الكونيدات (الشكل1-ب). اما النوع الثاني من العلائم فهي العلائم البايوكيميائية وتدعى بالعلائم الضاغطة (Forcing markers) وتعني ان السلالتين تحملان طفرات غذائية (Auxotrophic) مختلفة تكمل احداهما الاخرى في احتياجاتهما الغذائية ويستفاد منها للحفاظ على استمرارية متباين النوى على الوسط الادنى(M) ومنع تكسره الى مكونيه ويسمى بهذه الحالة متباين النوى المتوازن (Balanced heterokaryon) (Pontecorvo *et al.*,1953;Webster,1970) وهذا ما حصل فعلا مع متباين النوى المتكون بين السلالتين Chl_{10} وSel_2 إذ عند نقله الى وسط ال(M) والذي يسمح لمتباين النوى فقط بالنمو في حين انه يمنع نمو السلالتين الابويتين لعدم احتوائه على حاجتيهما الغذائيتين (ترترات الامونيوم كمصدر للنترات وحامض الميثيونين كمصدر للكبريت). علما ان عملية تكوين متباين النوى في هذا الفطر هي عملية غير هينة لذلك لم يقم بإجرائها سوى Tsuge وجماعته سنة 1987 باستعمال المطفر الكيميائي المسرطنNTG ، ومنذ ذلك الحين يلجأ الباحثون الى تحليل الجدر الخلوية للفطر *Alternaria alternata* ومن ثم تكوين المتباينات بعملية تدعى (Protoplast fusion) وتعتمد على عمليات كيميائية ليس لها علاقة بعزل الطافرات بالطرائق التقليدية (Wenderoth *et al.*, 2017; Saha *et al.*, 2012; Prub *et al.*, 2014). وبذلك تعد عملية تكوين متباين النوى في هذا الفطر الممرض للنباتات خطوة أولى في التحليل الوراثي شبه الجنسي وكذلك وسيلة سريعة وفعالة في إجراء اختبارات السيادة (Dominance tests) والتتام (Complementation tests) (Fincham *et al.*, 1979) ماعدا الحالات النادرة التي يحصل فيها التعبير الجيني (Gene expression) داخل النواة وحينها نحتاج إلى تكوين سلالات مضاعفة المجموعة الكروموسومية خليطة (Heterozygous diploids). وما عدا ذلك فإن نتائج الاختبارات تكون متطابقة سواءً أُجريت باستعمال متباين النوى (Heterokaryon) أم بسلالات مضاعفة المجموعة الكروموسومية الخليطة (Heterozygous diploids) (Pontecorvo, 1958; Fincham, 1966).

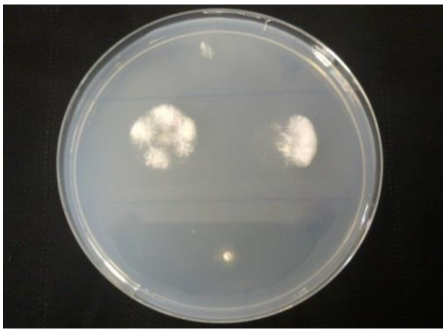


الشكل - أ-



الشكل - ب-

الشكل 1: أ- السلالة Chl_{10} ($nit_{10}, w_2^+ s_2^+$) السوداء الكونيدات ذات العوز الغذائي للنتروجين (*nit*)، ب- السلالة Sel_2 ($nit_{10}+, w_2 s_2$) البيضاء العوز الكونيدات ذات العوزالغذائي للكبريت (s_2).



الشكل 2: متباين النوى بين السلالتين Chl_{10} وSel_2 (الموضحتان في الشكل 1) بعد النمو لأربعة أيام على الوسط M.

المصادر العربية

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

ضاحي، ساهي جواد؛ هادي، هدى وليد(2012). عزل طافرات لونية ومقاومة في الفطر *Alternaria alternata*. مجلة علوم الرافدين،**23**(4) ،1-11.

ضاحي، ساهي جواد ؛ محمود، هبة خالد(2008). امكانية اندماج النوى وتنصيفها بفعل المضاد Griseofulvin في الفطر *Aspergillus amstelodami* . مجلة علوم الرافدين. **19**(3) ،46-56.

المصادر الأجنبية

Agrios, G.N. (2005). "Plant Pathology". Elsevier, Amsterdam.

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

Auerbach, C. (1976). "Mutation Research". Chapman and Hall, London.

Carlile, M.J.; Watkinson, S.C.; Gooday, G.W. (2001). "The Fungi." Elsevier, Amsterdam.

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.

Clutterbuck, A.J. (1974). *Aspergillus nidulas*. In: R.C. King ed. "Handbook of Genetics". Vol. 1, pp.447-510 Plenum Press, New York.

Cove, D.J. (1976a). Chlorate toxicity *in Aspergillus nidulans:* studies of mutants altered in nitrate assimilation. *Molec. gen. Gen.,* **146**, 147-159.

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

Drake, J.W. (1970). "The Molecular Basis of Mutation". Holden-Day, San Francisco.

Fincham, J.R. (1966). "Genetic Complementation. Benjamin", New York.

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

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

Lederberg, J.; Lederberg, E.M. (1952). Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.,* **63**, 399.

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

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

Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). "Fungi and Food Spoilage". Springer.

Pontecorvo, G. (1958). "Trends in Genetic Analysis". Oxford University Press, London.

Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; McDonald, K.D.; Hemmons, L.M.; Bufton, A.W.J. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans. Adv. Genet.*, **5**, 141-238.

Prub, S.; Fetzner, R.; Seither, K.; Herr, A.; Pfeiffer, E.; Metzler, M.; Lawrence, C.; Fischer, R.(2014). Role of the *Alternaria alternata* blue-light receptor lrea (white-collar 1) in spore formation and secondary metabolism. *Appl. Environ. Microbiol*, **80**, 2582-2591.

Rotem, J. (1994). “The Genus Alternaria: Biology, Epidemiology and Pathogenicity”. APS Press, St. Paul, MN.

Saha, D.; Fetzner, R.; Burkhardt, B.; Podlech, J.; Metzler, M.; Dang, H.; Lawrence, C.; Fischer, R. (2012). Identification of a polyketide synthase required for alternariol (aoh) and alternariol-9-methyl ether (ame) formation in *Alternaria alternate.P. One,* **7**, e40564.

Simmons, E.G. (1992). *Alternaria* taxonomy: current status, viewpoint, challenge. In: I. Chelkowski; A. Visconti (eds.). "Alternaria: Biology, Plant Disease and Metabolites". Elsevier, Amsterdam. pp 1-35.

Takano, Y.; Kubo, Y.; Kawamura, C.; Tsuge, T.; Furusawa, I. (1997). The *Alternaria alternata* melanin biosynthesis gene resotres appressorial melanization and penetration of cellulose membranes in melanin-deficient albino mutant of *Colletotrichum lagenarium. Fungal Gen. Biol.,* **21**, 131-140.

Tanabe, K.; Park, P.; Tsuge, T.; Kohmoto, K.; Nishimura, S. (1995). Characterization of the mutants of *Alternaria alternata* japanese pear pathotype deficient in melanin production and their pathogenicity. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, **61**, 27-33.

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 of auxotrophic mutants and heterokaryosis in *Alternaria alternata. Ann. Phytopathol. Soc. Japan,* **53**, 182-190.

Webster, J.(1970)." Introduction to Fungi". Cambridge University Press, London.

Wenderoth, M.; Pinecker, C.; Voß, B.; Fischer, R. (2017). Establishment of crispr/cas9 in *Alternaria alternate. Fungal Genetics and Biology.* **101**, 55-60.