الأساس الوراثي لمقاومة المبيد الفطري Carboxin في الفطر *Aspergillus amstelodami*(*)

ساهي جواد ضاحي **هناء رمضان الكيلي**

قسم علوم الحياة / كلية العلوم

جامعة الموصل / العراق

الاستلام **القبول**

٢٠٠٧ / ٠٩ / ٠٢ ٢٠٠٨ / ٠٣ / ٠٣

ABSTRACT

A Sample of 63 mutants resistant to the fungicide carboxin (Vitavax) was isolated in the parental strains A76 (*bwA nicA*, brown conidia, nicotinic acid-requiring) and AZG131 (*wA lysA azgA131*, white conidia, lysine-requiring and resistant to 8-azaguanine) of the ascomycetous fungus *Aspergillus amstelodami*. All mutants were normal in their morphology and recessive to their respective wild type alleles. Complementation tests in heterokaryons among the mutants put them all in a single gene designated *carA* (for resistance to carboxin) as the first gene of its kind to be identified in *A. amstelodami*. Haploidization analysis has shown that *carA* is not linked in any of the chromosomes I, II, III, IV or VII, but its linkage relation to the other groups (V, VI, VIII or IX) recognized in this fungus was not determined.

الملخص

تم عزل ٦٣ طافرة مقاومة للمبيد الفطري Carboxin (أو Vitavax) من السلالتين الابويتين A76 (*bwA nicA*) ذات الكونيدات البنية والحاجة الغذائية لفيتامين حامض النيكوتنيك و AZG131 (*lysA azgA wA*) ذات الكونيدات البيضاء والحاجة الغذائية للحامض الاميني اللايسين وا لمقاومة للعقار 8-azaguanine من الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami*، وقد كانت الطافرات جميعها طبيعية في مورفولوجيتها ومتنحية امام اليلاتها البرية. واظهرت اختبارات التتام باستخدام متباينات النوى المعمولة بين هذه الطافرات

(*) البحث مستل من رسالة الماجستير للباحثة الثانية.

فيما بينها ان جميع الطفرات هي طفرات اليلية لجين واحد اعطي الرمز الجيني *carA* (اشارة لمقاومته للمبيد Carboxin). وكان هذا الجين هو الاول من نوعه الذي يشخص في الفطر *A. amstelodami*.

ومن خلال التحليلات شبه الجنسية والتنصيف تبين ان الجين *carA* غير مرتبط في أي من المجاميع الكروموسومية (I، II، III، IV و VII) ولكن لم يحدد موقعه بالنسبة للمجاميع الاربع الاخرى (V، VI، VIII و IX) المشخصة لحد الان في هذا الفطر.

المقدمة

تعد الفطريات من اهم الممرضات النباتية وأكثرها انتشاراً وان الخسائر الاقتصادية المتسببة عنها تعد خسائر هائلة (العروسي وجماعته، ٢٠٠٣؛ شعبان والملاح، ١٩٩٣). وقد اتبعت طرق عد يدة لمكافحة الآفات الزراعية الفطرية والتقليل من اضرارها غير ان المكافحة الكيمياوية بالمبيدات الفطرية ماتزال ت حتل مركز الصدارة في طرق المكافحة وذلك لكفاءتها واستمرار فاعليتها لمدة طويلة بجانب سهولة إجرائها. غير انه سرعان ما ظهرت السلالات المقاومة للعديد من المبيدات الفطرية واصبح الكثير من هذه المبيدات محدود الفائدة ويتواصل البحث عن مبيدات جديدة (العروسي وجماعته، ٢٠٠٣).

يهدف البحث الحالي إلى عزل طافرات تلقائية ومستحثة بأشعة UVC مقاومة للمبيد الفطري Carboxin من الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami* لغرض دراسة الاساس الوراثي لهذه المقاومة.

المواد وطرائق العمل

الطرق المستخدمة في التحليل الوراثي للفطر *Aspergillus amstelodami* تعتمد أساساً على تلك التي و صفها واستخدمها كل من DeBertoldi & Caten (1979), Caten (1979) والتي تمثل بدورها تحويراً لطرق التحليلات الوراثية للفطر *Aspergillus nidulans* التي استخدمها Pontecorvo وجماعته في أوائل الخمسينات من القرن العشرين (Pontecorvo *et al*., 1953; Pontecorvo, 1958; Pontecorvo & Kafer, 1958; Kafer, 1958)

السلالات المستخدمة في الدراسة

ان التراكيب الجينية وأصول السلالات المستخدمة في الدراسة الحالية مبينة في الجدول ١- وهي جميعها محفوظة على بلورات جافة من السليكا جيل لدى الباحث الأول.

الجدول ١ : السلالات المستخدمة في الدراسة وتراكيبها الجينية ومصادرها

رقم السلالة	التركيب الوراثي	المصدر
AZG131	*azgA131 lysA wA*	الحمداني (١٩٨٥)
A76	*nicA bwA*	استحثت بأشعة UVC في A25 لاحظ DeBertoldi & Caten (1979)

دليل الرموز الجينية

١ –الرمز *wA* يشير الى الجين الطافر الذي يجعل لون الكونيدات بيضاء مقارنة باللون البري الأخضر.
٢ –الرمز *bwA* يشير إلى الجين الطافر الذي يجعل لون الكونيدات بنية بدلاً من الأخضر البري.
٣ –الرمز *azgA* يشير إلى الطفرة التي تضفي صفة المقاومة للمادة السامة 8-azaguanine.
٤ –الرمز الجيني *lysA* يمثل حاجة السلالة الحاملة له إلى الحامض الاميني اللايسين.
٥ –الرمز *nicA* يشير إلى جين العوز الغذائي للفيتامين حامض النيكوتنك لدى السلالات الحاملة له.

الأوساط الزرعية والكيمياويات

استخدم وسطان زرعيان أساسيان ومشتقاتهما (Caten, 1979) في هذه الدراسة وهما الوسط الأدنى أو غير المعضد (Minimal Medium, M)، ووسط مستخلص الشعير –ملح الطعام (Malt Extract-Salt Medium, MTS) وقد يضاف إلى الوسط، إذ ان النمط البري للفطر يمكنه النمو على وسط M، أما السلالات الطافرة المستخدمة في هذه الدراسة فلا تستطيع النمو على هذا الوسط إلا بعد إضافة الاحتياجات الضرورية لكل سلالة . وقد تضاف إلى الوسط الإضافة الكاملة Complete supplement بنسبة ٥ % حجم/حجم وعندها يلحق برمز الوسط الحرف (C) كما قد يضاف إلى الوسط ملح Sodium deoxycholate بتركيز نهائي قدره ٤٠٠ مايكروغرام/مل وعندها يلحق برمز الوسط الحرف (D) (Caten, 1979).

وبما ان درجة الحرارة المثلى للفطر هي ٣٠°م (Caten, 1979) فقد جرى التحضين عند هذه الدرجة.

عزل الطافرات المقاومة

جرى تحديد التركيز المثبط الأدنى(Minimal Inhibitory Concentration, MIC) من المبيد الفطري Carboxin الذي يوقف نمو السلالتين الابويتين A76 و AZG131 وذلك باختبار تراكيز متصاعدة من المبيد CAR. واعتباراً من الصفر ثم ٧.٥، ١٥، ٣٠، ٣٧.٥، ٤٥، ٥٢.٥، ٦٠، ٧٥ و ١١٢.٥ مايكروغرام لكل مل من وسط النمو M المعضد بالاحتياجات الغذائية لكل سلالة وجرى الزرع بطريقة الوخز النقطي (Point Inoculation) ثم سجلت النتائج بعد اربعة ايام من التحضين تلا ذلك عملية عزل الطافرات المقاومة حيث جرى عزل نوعين من الطافرات المقاومة هما التلقائية والمستحثة وجرى الحث بالأشعة فوق البنفسجية القصيرة الموجة (UVC) إذ كان مصدر الإشعاع المستخدم في هذه الدراسة هو مصباح UVC من نوع (NOP 189 Scottish Science) (Philip Harris) بطول موجي قدره ٢٥٣.٧

نانوميتر إذ يحضر عالق كونيدي كثافته بحدود 10^7 كونيده/مل من مزرعة نامية لثلاثة أيام على الوسط CMTSD. يقسم العالق الى قسمين 5 مل يستخدم لعزل الطفرات التلقائية و 10 مل يعرض للتشعيع (الجاف، 1990). يجرى الزرع بعدها بتلقيح 10 أطباق حاوية على التركيز السام من المبيد من كل من العالقين المشعع وغير المشعع وبواقع 0.1 مل/طبق ويحضن لمدة 4 أيام ويتحرى بعدها عن المستعمرات النامية التي عدت طافرات مقاومة . إذ جرى عزلها وتنقيتها بطريقة السبور المنفرد ومن ثم تأكيد مقاومتها بزرعها مرة أخرى على وسط المبيد .

طرق التحليل الوراثي:

استخدمت طرق التحليل الوراثي المرتكزة على تكوين متباين النوى لاجراء اختبارات السيادة والتتام وكذلك عزل النوى المضاعفة المجموعة الكروموسومية وتنصيفها لاسناد الجينات الجديدة إلى مجاميعها الارتباطية (الكروموسومية) وذلك كما استخدمها DeBertoldi & Caten (1979) و Dhahi (1978) من دراسات وراثية مماثلة في هذا الفطر.

النتائج والمناقشة

التركيز المثبط الادنى للمبيد الفطري كاربوكسين Carboxin (CAR)

يتضح من نتائج الجدول– ٢ ان النمو قد توقف عند التركيز 75 مايكروغرام/مل بالنسبة للسلالة A76. أما بالنسبة للسلالة AZG131 فكان توقف النمو عند التركيز 52.5 مايكروغرام/مل واعتبر هذا ال تركيز هو MIC لكل سلالة والتي استخدمت لعزل الطافرات المقاومة.

الجدول ٢ : نمو السلالتين الابوتين A76 و AZG131 على تراكيز مختلفة من المبيد الفطري Carboxin (CAR)

تركيز CAR (µg/ml)	نمو السلالة A76 على		نمو السلالة AZG 131 على	
	nic + M	CAR + nic + M	lys + M	CAR + lys + M
0	+	+	+	+
7.5	+	+	+	+
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
37.5	+	+	+	+
45	+	+	+	±
52.5	+	+	+	-
60	+	±	+	-
75	+	-	+	-
112.5	+	-	+	-

+ نمو تام، ± نمو جزئي، – عدم نمو

عزل الطافرات:

جرى عزل ٥٥ طافرة من السلالة A76 وكان ٥١ منها طافرة مستحثة باشعة UVC و ٤ طافرات تلقائية. وكذلك تم عزل ٨ طافرات من السلالة AZG131 جميعها مستحثة. وتماشياً مع نظام تسمية الطافرات (Mutants) والطفرات (Mutations) في الفطر *A. nidulans* (Clutterbuck, 1973, 1974)، فقد اعتمدنا الرمز CAR للطافرات و *car* للطفرات مثلما فعل VanTuyl (1977) الذي عزل طفرات مقاومة لهذا المبيد (Carboxin) في الفطر *A. nidulans* واستعمل هذين الرمزين للغرض نفسه.

ولذلك أعطيت الطافرات المعزولة من السلالة A76 الرمز CAR1، ...، CAR55 واعطيت طفراتها المقابلة الرمز *car1* ، ...، *car55* فيما أعطيت الطافرات المعزولة من السلالة AZG131 رموزاً مكملة للرموز المستعملة مع طافرات السلالة A76 أي اعطيت الرموز CAR56، ...، CAR63 ورموز جينية مقابلة هي *car56* ، ...، *car63*. وكانت جميع الطافرات المعزولة من السلالتين ذات مورفولوجية طبيعية من حيث شكل النمو وانتاج الكونيدات.

اختبارات السيادة والتتام:

لاختبار الطافرات المقاومة للمبيد والمعزولة من كلتا السلالتين A76 و AZG131 هل هي سائدة او متنحية نسبة الى اليلاتها البرية جرى عمل متباينات النوى بين كل من الطافرات البنية (المعزولة من السلالة الابوية A76) والسلالة الأبوية AZG131، وبين كل من الطافرات البيضاء (المعزولة من السلالة الابوية AZG131) والسلالة الأبوية A76 وكما جاء في DeBertoldi & Caten (1979) و Dhahi (1978) ومن خلال الزرع على الوسطين MD و MD+CAR نمت جميع متباينات النوى على الوسط الاول ولكنها فشلت في النمو على الوسط الثاني وهذا يدل على ان جميع الطافرا ت هي طافرات متنحية وقد توصل VanTuyl (1977) الى الاستنتاج نفسه بشأن تنحي الطافرات المقاومة للمبيد كاربوكسين في الفطر *A. nidulans*. وصفة التنحي هي ظاهرة عامة في الطفرات المقاومة للمبيد (العادل وعبد، ١٩٧٩). ان كون الطفرات متنحية او شبه متنحية امر متوقع لان كل كائن حي هو نتاج تاريخ طويل من الانتخاب والتطور وصولاً الى تواجده بصورته الحالية من التوازن والتكيف البيئي وان أي تغير في نظامه هذا بسبب الطفرة سيؤدي الى الاخلال بنظامه البايولوجي المتوازن وتكيفه البيئي (Strickbeger, 1976; Hartle & Clarck, 1997; Lewin ,2004).

إسناد الجين *carA* الى مجموعته الارتباطية

لمعرفة موقع الجين *carA* فقد جرى بناء سلالة مضاعفة المجموعة الكروموسومية (تحمل علائم وراثية على خمس ة من مجاميع الارتباط) بين الطافرة CARA6 ذات التركيب الجيني (*wA lysA azgA carA*) مع السلالة المرجعية A76 ذات التركيب الجيني (*bwA nicA carA*$^{+}$) وجرى تنصيف هذه السلالة المضاعفة المجموعة الكروموسومية الخضراء اللون باستخدام المبيد الفطري بنليت (Hastie, 1970) وبتركيز (٠.٣) مايكروغرام لكل مل من الوسط الزرعي CMTS (Saadulla, 2005) وبعد التحضين لمدة (٦) ايام جرى عزل (٤٦) قطاعاً لونياً مستقلاً منصفاً بطريقة عشوائية وبالزرع على الاوساط الانتقائية ومتابعة انعزال الجين *carA* مع كل من العلائم الوراثية الخمس من السلالتين A76 و AZG131 لاحظنا وكما هو موضح في الجدول –٣ ان الجين *carA6* ينعزل انعزالاً حراً مع الجين *bwA* حيث ان نسبة التراكيب الجديدة (Recombinants) بين الجينين كان (١٤) من اصل (٢٢) قطاعاً وهذا يمثل نسبة (٦٣.٦٣%) على الكروموسوم الاول (I). ويلاحظ من الجدول–3 ان عدد المنعزلات اختزل من (٤٦) الى (٢٢) منعزلة وذلك لان هذا الجين لا يمكن تعقبه الا في المنعزلات الملونة فقط دون البيضاء . اما نسبة التراكيب الجديدة بين الجين *carA6* والجين *wA* بلغت (٢٥) من اصل (٤٦) أي بنسبة (٥٤.٣٤%) على الكروموسوم الثاني (II). اما انعزال الجين *carA* مع الجين *lysA* بلغت نسبة التراكيب الجديدة (٣٣) من اصل (٤٦) أي بنسبة (٧١.٧٣%) على الكروموسوم الثالث (III). اما بالنسبة لانعزال الجين *carA* مع الجين *nicA* فكانت نسبة التراكيب الجديدة (١٧) من اصل (٤٦) أي بنسبة (٣٦.٩٥%) على الكروموسوم الرابع (IV). واخيراً فان انعزال الجين *carA* مع الجين *azgA* بلغت نسبة التراكيب الجديدة (٢٨) من اصل (٤٦) أي بنسبة (٦٠.٨٦%) على الكروموسوم السابع (VII). وهذه النتائج تدل على ان الجين *carA6* يتوزع توزيعاً حراً مع جميع العلائم في السلالتين A76 و AZG131 ولم يبد تلازماً مع أي من علائمهما الوراثية مما يشير الى عدم ارتباطه على أي من الكروموسومات المعلمة لهاتين السلالتين. أما بالنسبة للمجاميع الارتباطية الاخرى الم شخصة في هذا الفطر (DeBertoldi & Caten, 1979; Dhahi, 1996) فلم تتوفر السلالات المرجعية التي تحمل العلائم الوراثية في حينها ولذا لا يمكن الجزم ما إذا كان الجين *carA* مرتبطٌ في إحدى المجاميع المشخصة الاربع الاخرى او انه يمثل مجموعة جديدة مستقلة .

الجدول ٣ : انعزال الجين *carA6* مع العلائم الوراثية في السلالة المرجعية A76 من القطاعات المنصفة (Haploid) للسلالة الثنائية المجموعة الكروموسومية الخلطية A76/CARA6

Diploid A76 + *bwA* + + *nicA* +
CARA6 : *carA6* + *wA* *lysA* + *azgA*

Linkage group		I		II		III		IV		VII	
Marker in linkage group		*bwA*		*wA*		*lysA*		*nicA*		*azgA*	
Mutation		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
carA6	+	1*	4	5	8*	8	5*	5*	7	2	10*
	-	4	13*	17*	16	28*	5	22	12*	18*	16
Total		22		46		46		46		46	
Recombinants%		63.63		54.34		71.73		36.95		60.86	

* التراكيب الجديدة (Recombinants)

\+ يمثل الاليل البري لكل جين

– يمثل الاليل الطافر للجين المعني

المصادر References

المصادر العربية

١) الجاف، بـهروز محمود (١٩٩٠). دراسة وراثية لمقاومة بعض مضادات ا لمايتوز في الفطر *Aspergillus amstelodami*، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

٢) شعبان، عواد والم لاح، نزار مصطفى (١٩٩٣). المبيدات. دار الكتب للطباعة والنشر، الموصل، العراق.

٣) العادل، خالد محمد وعبد، مولود كامل (١٩٧٩). المبيدات الكيمياوية في وقاية النبات، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

٤) العروسي، حسين وميخائيل، سمير وعبد الرحيم، محمد علي (٢٠٠٣). مكافحة الأمراض النباتية، مكتبة المعارف الحديثة، الإسكندرية، مصر .

٥) الحمداني، غادة عبد الله (١٩٨٥). وراثة المقاومة للعقاقير السامة في الفطر *Aspergillus amstelodami*، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق .

المصادر الأجنبية

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

7) Clutterbuck, A. J. (1973). Gene symbols in *Aspergillus nidulans*. *Gent. Res., 21* : 291 – 296.

8) Clutterbuck, A. J. (1974). *Aspergillus*. In: R. C. King (ed.) *Handbook of Genetics. 1*: 447 – 510. Plenum Press, New York.

9) DeBertoldi, M. and Caten, C. E. (1979). The production of heterozygous diploid and haploidization analysis in *Aspergillus amstelodami*. *Genet. Res., 34* : 239 – 252.

10) Dhahi, S. J. (1978). *Genetic Studies in Aspergillus amstelodami*. Ph. D. thesis, University of Birmingham, England.

11) Dhahi, S. J. (1996). Constructive master strains for Assigning gens to Linkage groups in *Aspergillus amstelodami*. *J. Scien., 37*: 441–454.

12) Hartle, D. L. and Clarck, A. G. (1997). *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts.

13) Hastie, A. C. (1970). Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids. *Nature, 226* : 771.

14) Kafer, E. (1958). An. 8-chromosome map of *Aspergillus nidulans*. *J. Adv. Genet., 9* : 105 – 145.

15) Lewin, B. (2004). *Gene VIII*. Wiley, New York.

16) Pontecorvo, G. (1958). *Trends in Genetic Analysis*. Columbia University Press, New York.

17) Pontecorvo, G. and Kafer, E. (1958). Genetic analysis based on mitotic recombination. *Adv. Genet., 9* : 71 – 104.

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

19) Saadulla, A. A. M. (2005). Genetics of Resistance to Antifungal Drugs. M.Sc. Thesis, Duhok University, Iraq.

20) Strickbeger, M. (1976). *Genetics*. MacMillan, New York.

21) VanTuyl, J. M. (1977). *Genetics of Fungal Resistance to Systemic Fungicides*. Ph. D. Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.