

التنوع الوراثي بين عزلات لبعض الفطور الممرضة للحشرات المعزولة من مناطق مختلفة

فاتح خطيب¹، أحمد كركوكلي¹، عبد الناصر تريسي¹ ومصطفى البوحسيني²

(1) قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة حلب، حلب، سورية، البريد الإلكتروني: khatib_fateh@yahoo.com

(2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص ب 6299، الرباط، المغرب

الملخص

خطيب، فاتح، أحمد كركوكلي، عبد الناصر تريسي ومصطفى البوحسيني. 2016. التنوع الوراثي بين عزلات لبعض الفطور الممرضة للحشرات المعزولة من مناطق مختلفة. مجلة وقاية النبات العربية، 34(1): 52-61.

أُسهم تقدير الاختلافات الوراثية للفطور الممرضة للحشرات في تطوير الاستراتيجيات الفعالة للمكافحة الحيوية. تم خلال هذه الدراسة جمع 24 عزلة تتبع ثلاثة أنواع من الفطور الممرضة للحشرات من مناطق جغرافية مختلفة، نصفها تقريباً من سورية. تم تحديد التنوع الوراثي باستخدام تقنية الحمض النووي الريبي المنزوع الأكسجين (د ن ا) (DNA) متعدد الأشكال ومضخم عشوائياً (Random amplified polymorphic DNA (RAPD) واستخلاص الد ن ا من الميسيليوم الطازج باستخدام طريقة (CTAB) cetyltrimethylammonium bromide. تم قياس تركيز الد ن ا والتأكد من نقاوته عن طريق قياس قيمة الإمتصاص بواسطة المطياف الضوئي عند طول موجة 260 و 280 نانومتر. كما تم التأكد من سلامة الد ن ا وخلوه من التقطيع عن طريق الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز تركيز 1%. تم اختبار 24 بادئة عشوائية على العزلات التي تم دراستها وأظهرت النتائج الحصول على تراكيز عالية من الد ن ا بلغت وسطياً 3.2 ميكروغرام/ميكروولتر للفطر *Lecanicillium lecanii* و *Beauveria bassiana* (Balsmo) Vuillemin و 2.9 ميكروغرام/ميكروولتر لكل من الفطرين *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries و *Lecanicillium lecanii* (Zimmermann) Viégas، ونقاوة 1.7 لكل الأنواع. أعطت 4 بادئات تعدداً شكلياً وتم توزيع العزلات ضمن عنقودين رئيسيين تبعاً لنوع الفطر؛ ضم العنقود الأول جميع عزلات الفطر *Isaria*، بينما ضم العنقود الثاني تحت عنقودين يحتوي الأول عزلات الفطر *Beauveria*، وتحت العنقود الثاني عزلات الفطر *Lecanicillium*. أظهر المؤشر الجزئي P793 كفاءة في التمييز بين الفطور التي تمت دراستها بالمقارنة مع باقي المؤشرات. في حين لم تستطع المؤشرات الجزئية المستخدمة فصل العزلات تبعاً لمنطقة الانتشار الجغرافي. تم الحصول على مجال من التشابه بين العزلات وفق معامل Jaccard تراوح ما بين 6-100، 18-86، 17-56% بالنسبة لعزلات الفطور *Beauveria*، *Isaria*، *Lecanicillium*، على التوالي، مما يعكس تبايناً وراثياً كبيراً بين العزلات لكل نوع من الفطور التي تمت دراستها.

كلمات مفتاحية: استخلاص، د ن ا، تعدد شكلي، مؤشرات جزئية، RAPD.

المقدمة

في دراسة التنوع الوراثي للكائنات الحية المختلفة بما فيها الفطور، وذلك بعد أن كان يعتمد على الخصائص الشكلية كحجم الأبواغ وشكلها، وهي بدورها غير كافية للتمييز بين الأنواع أو السلالات الفطرية (14). استخدمت المؤشرات الجزئية في دراسات عديدة لتقويم التعدد الشكلي في الفطور الممرضة للحشرات والبحث في إمكانية وجود ارتباط بين النمط الوراثي والمنطقة الجغرافية والقدرة الإمراضية أو المجال العائلي (8، 9، 16).

توجد طرائق جزئية كثيرة متبعة في دراسة التنوع الوراثي للفطور، فقد استخدمت عدد من الطرائق الجزئية غير المتخصصة والمعتمدة على الـ PCR، وأكثر هذه الطرائق انتشاراً هي تقنية الد ن ا متعدد الأشكال والمضخم عشوائياً Random Amplified Polymorphism (RAPD) وبشكل خاص على جنس الفطر *Beauveria* Vuillemin (11). استخدمت تقنية RAPD في الدراسات البيئية

تتميز الفطور الممرضة للحشرات بمجال عائلي واسع، بالرغم من تباين عزلاتها المختلفة أو أنماطها الوراثية في مجالها العائلي (26، 27)، وبالتالي فإن وجود عزلات فطرية محلية عالية الشراسة ضد نوع حشري محدد هو عامل مساعد لنجاح برامج مكافحة الحيوية؛ ولذلك يتم البحث عن السلالات التي تتسم بشراسة تجاه الآفة المستهدفة، حيث يعتبر ذلك نقطة البداية في تطبيق برامج مكافحة الحيوية للآفات (24).

اتجهت أبحاث مكافحة الحيوية حالياً نحو دراسة التنوع الوراثي للعزلات الفطرية بشكل منتظم، ليعطي فكرة عن التنوع الطبيعي لهذه الفطور، والذي يعتبر مصدراً رئيساً للحصول على أنماط وراثية جديدة. أصبحت الطرائق الجزئية المعتمدة على الد ن ا هي الطرائق المتبعة

مواد البحث وطرائقه

عزلات الفطور المستخدمة

تم في هذه الدراسة استخدام 24 عزلة فطرية ممرضة للحشرات، ضمت 10 عزلات *Beauveria bassiana* و11 عزلة *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries وثلاث عزلات *Lecanicillium lecanii* Viégas (Zimmermann)، تم جمعها من أربعة بلدان هي سورية وتركيا وروسيا وإيران، وتم عزلها جميعاً من حشرة السونة باستثناء عزلة وحيدة من سوسة النخيل (العزلة SLV) وأخرى من الجعالات (العزلة 418) (جدول 2).

استخلاص الـ DNA

تم استخلاص الـ DNA من الميسيليوم الطازج للعزلات المدروسة بطريقة CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) وذلك وفق الخطوات المقترحة من قبل Neuhauser وآخرون (15).

تم إكثار العزلات على مستنبت SDYA ¼ لمدة 2-3 أيام، ثم حصد الميسيليوم في أنابيب سعة 2 مل. وزنت كمية 20 مغ من الميسيليوم الطازج من كل عزلة، وطحنت في جهاز طحن العينات (من نوع Retsch 200 mm, Germany) في كمية 100 ميكرو لتر من محلول الاستخلاص CTAB، والمكون من (100 ميلي مولر Tris-HCl، 20 ملي مولر EDTA، pH=8، 1.4 مولر NaCl، 2% CTAB)، وذلك لمدة 45 ثانية، باستخدام ثلاث كرات زجاجية. تم تقطيل العينات لثواني معدودة بهدف جمعها أسفل الأنبوب، ثم أضيفت كمية 400 ميكرو لتر من محلول الاستخلاص المسخن مسبقاً عند الدرجة 65 °س. وتم بعد ذلك تحضين العينات لمدة 1 ساعة عند 65 °س مع التحريك ثم إضافة 400 ميكرو لتر من مزيج الكلوروفورم مع ايزوميل الكحول (نسبة 1:24) ثم خلط العينات بواسطة الرجراج (Vortex)، وترسيب العينات لمدة 5 دقائق عند سرعة 10000 دورة/دقيقة، ثم نقل الرائق إلى أنبوب جديد ومعقم (سعة 1.5 مل). تم تكرار الخطوات السابقة مرتين (إضافة مزيج الكلوروفورم وايزوميل الكحول ثم التثقيب). كما تم إضافة 200 ميكرو لتر من أسيتات الأمونيوم 5 مولر (5 M ammonium acetate) ثم تحضين العينات لمدة 30 دقيقة على الأقل في البراد عند 4 °س، ثم فصلها بالطرد المركزي لمدة 20 دقيقة عند 4 °س وسرعة 13000 دورة/دقيقة. تم ترسيب الـ DNA عن طريق إضافة حجم مماثل (للائق) من كحول الايزوبروبانول البارد (-20 °س) ثم حفظت العينات في الثلاجة عند -20 °س طوال الليل. تم فصل الراسب بالطرد المركزي لمدة 15 دقيقة عند 4 °س وسرعة 13000 دورة/دقيقة و غسله مرتين بالكحول الايتيلي البارد (-20 °س) تركيز 70% لمدة 10 دقائق، ثم جفف الراسب (DNA) لمدة 30 دقيقة

للفطور الممرضة للحشرات، بالمشاركة مع الطرق المتخصصة للفصل بين الأنماط الوراثية لعزلات الفطر *Metarhizium anisopliae* Sorokin (Metschnikoff) التي تم عزلها من التربة في كندا وتم من خلالها ربط هذه الأنماط الوراثية مع أصل العزلة (5).

أما التقنية الأخرى فهي (UP) PCR Universally primed التي يعتمد تفاعل البوليميريز المتسلسل على استخدام بادئات عامة أطول من البادئات العشوائية السابقة، وبالتالي يكون لها درجات حرارة التحام annealing temperature أعلى؛ مما يزيد من قوة نتائج مثل هذه البادئات فيما يخص مقارنة النتائج بين المختبرات (6، 7، 13).

هناك أيضاً طرائق متخصصة ومعتمدة على الـ PCR؛ حيث تعد طريقة هضم منتجات الـ PCR بواسطة إنزيمات القطع لمناطق معينة من الـ DNA التي تم إكثارها، مثل مورثات الفاصل المستسخ الداخلي (ITS) internal transcribed spacer، أحد أكثر هذه الطرائق شيوعاً وتعرف هذه التقنية باسم تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل لقطعة الحصر ذات التكوين والطول المتعدد (Restriction PCR-RFLP (Fragment Length Polymorphism). ولقد تم استخدام هذه التقنية في التمييز بين النوعين *Beauveria* و *Metarhizium* (5).

كما استخدم مؤخرًا تقنية عديد التكوين ذو القطعة الطولية المضخمة Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) - وهي الطريقة الأكثر قابلية للتكرار - للتمييز بين الأنماط الوراثية لكل من الفطرين *M. anisopliae* و *B. bassiana* (7، 8، 10).

من الطرائق المتخصصة أيضاً تقنية تكرر التسلسل البسيط المتداخل PCR (ISSR) Inter-simple sequence repeats. وتستهدف هذه الطريقة مناطق خاصة في المجين هي عبارة عن تكرارات التسلسل البسيط أو التتابع الدقيقة (SSRs) أو (microsatellites)، وطبقت هذه الطريقة في البصمة الوراثية على مجموعة من عزلات الفطر *Beauveria* في اليابان (20)، والصين (23).

نفذت هذه الدراسة في مختبر أبحاث وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة حلب عام 2014، وقد تم الحصول على العزلات والأجهزة والمواد اللازمة للعمل من مختبر الممرضات الحشرية في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا). وقد هدف البحث إلى تقويم التنوع الوراثي لعزلات من ثلاثة أنواع من الفطور الممرضة للحشرات، تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة وذلك باستخدام تقنية الـ DNA متعدد الأشكال والمضخم عشوائياً RAPD.

تم في المرحلة الأولى عملية فصل أولي initial denaturation لسلسلة ال d ن ا المزوجة عند 94 °س لمدة 4 دقائق ولدورة واحدة، تبعها ثلاثة مراحل كررت 40 مرة وهي: الفصل الثانوي secondary denaturation عند 94 °س لمدة 1 دقيقة، ثم التحام البادئات primer annealing عند 35 °س لمدة 1 دقيقة، والامتداد extension عند 72 °س لمدة دقيقتين. أجريت مرحلة الامتداد النهائي final extension عند 72 °س لمدة 10 دقائق، ولمرة واحدة فقط، ثم حفظت نواتج التفاعل عند 4 °س.

جدول 1. تسلسل البادئات المستخدمة في دراسة التنوع الوراثي للفطور الممرضة للحشرات.

Table 1. Sequences of the used RAPD primers in genetic diversity analysis of entomopathogenic fungi.

التتابع النكليوتيدي للبادئة Primer sequence	رمز البادئة Primer code	مسلسل Order
5'-CAATCGCCGT-3'	OPA-11	1
5'-AGCGCCATTG-3'	OPD-11	2
5'-ACGGATCCTG-3'	OPF-01	3
5'-CCGAATTCCC-3'	OPF-05	4
5'-GGGAATTCGG-3'	OPF-06	5
5'-GGAAGCTTGG-3'	OPF-10	6
5'-ACGGTACCAG-3'	OPF-12	7
5'-GGAGTACTGG-3'	OPF-16	8
5'-ACCTGGACAC-3'	OPI-01	9
5'-CAGCGACAAG-3'	OPI-07	10
5'-TGGAGAGCAG-3'	OPI-09	11
5'-TGCCCAGCCT-3'	OPI-18	12
5'-CCAAGCTGCC-3'	OPP-16	13
5'-AGTCGGGTGG-3'	OPS-11	14
5'-GCGGAAATAG-3'	784P	15
5'-CCGCAGCCAA-3'	785P	16
5'-GCGATCCCCA-3'	786P	17
5'-GCGATCCCCA-3'	787P	18
5'-AACGCGCAAC-3'	788P	19
5'-AGCCA8GTTTC-3'	789P	20
5'-GTCAACGAAG-3'	790P	21
5'-GAG ACTCCCC-3'	791P	22
5'-GGTACTCCCC-3'	792P	23
5'-GACCGACCCA-3'	793P	24

أضيف لمزيج التفاعل كمية 5 ميكرولترات من محلول التحميل، ثم حملت كمية 10 ميكروليتر منه على هلامه أغاروز تركيز 1.5%، وتمت عملية الرحلان الكهربائي لمدة 45 دقيقة عند فرق كيون 100 فولت. لونت الهلامه بغمرها في محلول بروميد الاينيديوم لمدة 30 دقيقة مع التحريك الخفيف، ثم تم تظهيرها تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام.

تحت ظروف درجة حرارة المختبر. تم إضافة كمية 50 ميكروليتر من المحلول المنظم 1xTE الحاوي على الأنزيم RNase بتركيز 100 ميكروغرام/مل، ثم تم تحضين العينات لمدة نصف ساعة عند 37°س ومن ثم حفظت العينات في البراد لحين استخدامها.

تم قياس تركيز ال d ن ا باستخدام المطياف الضوئي (Spectrophotometer) بالامتصاص عند طول موجة 260 نانومتر وموجة 280 نانومتر، ثم حُسبت نقاوة ال d ن المستخلص من خلال النسبة بين القراءتين 280/260، حيث يجب أن تتراوح في العينات الخالية من البروتين ما بين 1.8 – 2.0 (18).

تم اختبار نوعية ال d ن ا أيضاً بالرحلان الكهربائي ضمن هلامه أغاروز تركيز 1%، حيث تم تحميل كمية 10 ميكروليتر مزيج مكون من 5 ميكروليتر DNA + 3 ميكروليتر ماء معقم منزوع الشوارد + 2 ميكروليتر محلول تحميل 6x loading dye buffer). تمت عملية الرحلان في المحلول المنظم 1xTBE لمدة ساعة واحدة عند فرق كيون 50 فولت. ولونت الهلامه بغمرها في محلول بروميد الاينيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل لمدة 30 دقيقة مع التحريك الخفيف، ثم ظهرت الهلامه تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام gel documentation (من نوع Eagle EyeII Stratagene، ألمانيا)، و التقطت صورة رقمية للهلامه لتحليلها.

تقنية ال d ن ا المتعدد الأشكال والمضخم عشوائياً Random Amplified Polymorphic DNA

يعتمد هذا الاختبار على تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR، وذلك باستخدام بادئات عشوائية قصيرة يتكون كل منها من 10 نكليوتيدات. استخدم في هذا الاختبار 24 بادئة عشوائية تم الحصول عليها من شركة تجارية (The Midland Certified Reagent Co)، الولايات المتحدة الأمريكية) (جدول 1) على عدد محدود من العينات، ثم تم تطبيق البادئات التي أظهرت تعدداً شكلياً polymorphism على جميع العزلات المدروسة.

تم تحضير مزيج التفاعل في حجم نهائي 30 ميكروليتر؛ حيث احتوى المزيج لكل عينة على 3 ميكرولترات د ن ا (50 نانوغرام/ميكروليتر)، 3 ميكرولترات من المحلول المنظم للتفاعل (10x PCR buffer الحاوي على 15 ميليمولر كلوريد المغنيزيوم MgCl₂)، 3 ميكرولترات من النيوكليوتيدات الأربعة dNTP's (تركيز 2 ميليمولر لكل منها)، 1.2 ميكروليتر من كل بادئة (تركيز 10 ميكرومولر)، 0.4 ميكروليتر من أنزيم بلمرة ال d ن ا (Taq DNA polymerase) تركيز (5 وحدة/ميكروليتر)، وأكمل الحجم بكمية 18.2 ميكروليتر ماء مقطر منزوع الشوارد. تمت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع (Eppendorf Mastercycler, Germany) وذلك وفق عدة خطوات.

النسبة كافية لاستخدام هذا الحمض النووي في الاختبارات الجزيئية وبخاصة تفاعل البوليميريز المتسلسل PCR.

عند اختبار نوعية الـ DNA على هلامه أغاروز تركيز 1%، أظهرت النتائج الحصول على نوعية جيدة ذات وزن جزيئي عالي وخالية من التقطيع، حيث ظهر الـ DNA على شكل حزمة واحدة في أعلى المسارات في الهلام. كما كانت العينات خالية من الحمض النووي الريبي RNA نتيجة استخدام الأنزيم Rnase أثناء عملية الاستخلاص (شكل 2).

تشير النتائج المتحصل عليها إلى كفاءة الطريقة المتبعة في عملية الاستخلاص من الفطور، حيث أمكن الحصول على تراكيز كافية من الـ DNA غير المجزأ وبنوعية ونقاوة جيدة. تميزت هذه الطريقة بسرعة الاستخلاص بالمقارنة مع الطريقة التقليدية التي تتبع فيها عملية التجفيد للعينات لمدة ثلاثة أيام على الأقل ثم طحنها بوساطة جهاز طحن العينات في حال توافره في المختبر، حيث يمكن بهذه الطريقة تحطيم الجدر الخلوية للميسيليوم ضمن كمية قليلة من محلول الاستخلاص مباشرة ثم إكمال الحجم والبدء بعملية الاستخلاص. بينما الطريقة التقليدية الأخرى المتبعة في عمليات الاستخلاص من الأنسجة أو الكائنات المختلفة هي استخدام النيتروجين السائل لتبريد وتقسية الأنسجة ثم سحقها في الهاون لحل الجدر الخلوية ميكانيكياً، ومن ثم إضافة محلول الاستخلاص الساخن. وبذلك تتفوق طريقة الاستخلاص المتبعة في هذه الدراسة على طريقة السحق بالنيتروجين السائل بإمكانية القيام بعملية الاستخلاص دون الحاجة للنيتروجين السائل وبخاصة عند عدم توافره.

لمقارنة أحجام القطع الناتجة (الحزم bands) تم تحميل كمية 6 ميكرو لتر من مؤشر قياسي للوزن الجزيئي بتردد 100 زوج نكليوتيدي في الحفرة الأولى من كل مشط.

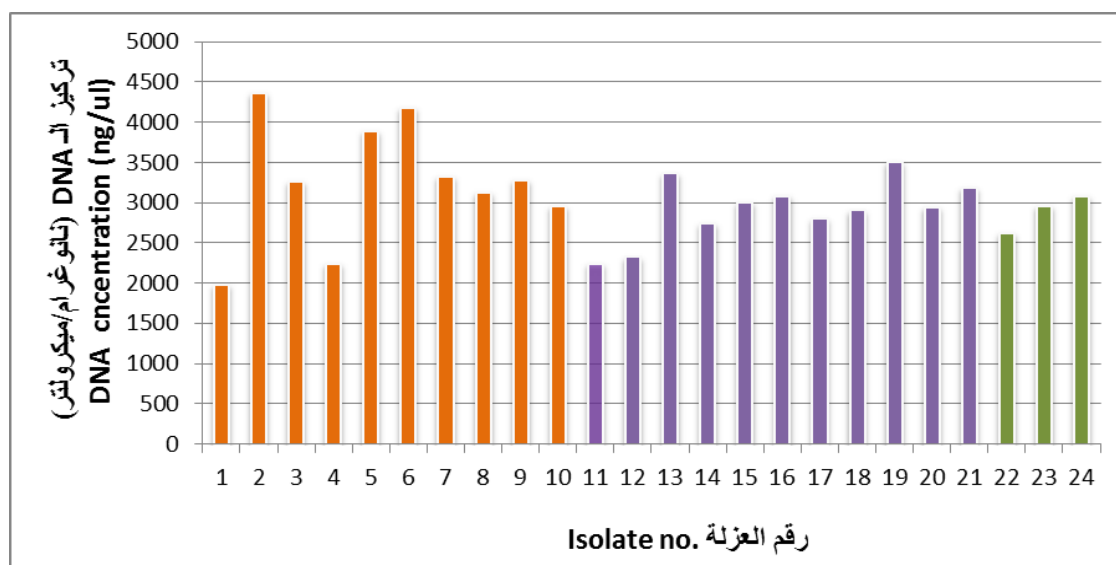
أخذت صورة رقمية للهلام، وتمت قراءة النتائج وفق نظام العد الثنائي؛ حيث أعطي الرقم 1 في حال وجود الموقع الوراثي (الحزمة band)، و 0 في حال غيابه. تم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل القرابة dendrogram، وحساب نسبة التشابه بين العزلات باستخدام معامل Jaccard.

النتائج والمناقشة

تركيز ونوعية الـ DNA

أظهرت نتائج استخلاص الـ DNA الحصول على تراكيز كافية من الفطور الثلاثة المدروسة، وذلك وفق قراءة جهاز المطياف الصوتي. تراوح تركيز الـ DNA بين 1.9-4.3 (وسطياً 3.2) ميكروغرام/ميكرو لتر، و 2.2-3.5 (وسطياً 2.9) ميكروغرام/ميكرو لتر، و 2.6-3.0 (وسطياً 2.9) ميكروغرام/ميكرو لتر لعزلات كل من الفطور *B. bassiana* و *I. farinosa* و *L. lecanii*، على التوالي (شكل 1).

كما بينت نتائج حساب نسبة امتصاص الأشعة فوق البنفسجية 280/260 أن النقاوة كانت جيدة، والعينات خالية من البروتين نسبياً حيث تراوحت النسبة عموماً بين 1.5-1.8 (وسطياً 1.7) للعزلات المختلفة من الفطور الثلاثة التي تمت دراستها (جدول 2). وتعد هذه

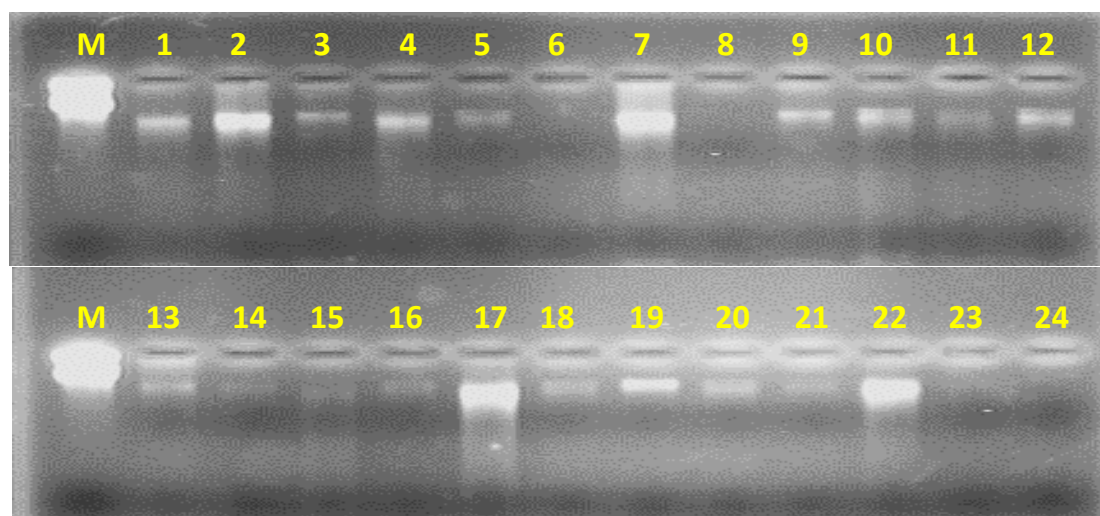


شكل 1. تركيز الـ DNA للمستخلص من عزلات لثلاثة أنواع من الفطور الممرضة للحشرات.

Figure 1. Concentration of DNA extracted from isolates of three entomopathogenic fungi

Table 2. DNA concentration and purity according to spectrophotometric reading.

نسبة الامتصاص 280/260 (A260/A280)	تركيز الد ن ا (نانوغرام/ميكرو لتر) DNA concentration (ng/μl)	النوع Species	رمز العزلة Isolate code	رقم العزلة Isolate no.
1.6	1980	<i>B. bassiana</i>	DER	1
1.5	4360	<i>B. bassiana</i>	184	2
1.6	3260	<i>B. bassiana</i>	ARIHA	3
1.5	2240	<i>B. bassiana</i>	SP2	4
1.5	2240	<i>I. farinosa</i>	PF1	5
1.5	2320	<i>I. farinosa</i>	564	6
1.5	3360	<i>I. farinosa</i>	418	7
1.6	2620	<i>L. lecanii</i>	SLV	8
1.6	3880	<i>B. bassiana</i>	145	9
1.7	2740	<i>I. farinosa</i>	523B	10
1.6	3000	<i>I. farinosa</i>	175	11
1.8	3080	<i>I. farinosa</i>	PF6	12
1.7	4180	<i>B. bassiana</i>	SPT1	13
1.8	2960	<i>L. lecanii</i>	271	14
1.6	3320	<i>B. bassiana</i>	127	15
1.8	2800	<i>I. farinosa</i>	PF5	16
1.8	3120	<i>B. bassiana</i>	126	17
1.8	2900	<i>I. farinosa</i>	PF2	18
1.7	3500	<i>I. farinosa</i>	PF3	19
1.8	2940	<i>I. farinosa</i>	50	20
1.7	3180	<i>I. farinosa</i>	PF4	21
1.8	3280	<i>B. bassiana</i>	159	22
1.8	2960	<i>B. bassiana</i>	153	23
1.8	3080	<i>L. lecanii</i>	309/1	24



شكل 2. الرحلان الكهربائي للد ن ا المستخلص من عزلات الفطور المدروسة ضمن هلامة أغاروز تركيز 1%.
المسار M: مؤشر قياسي لأمدا λDNA - *B. bassiana*: المسارات lanes 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 17, 22, 23 - *I. farinosa*: المسارات lanes: 5, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 21 - *L. lecanii*: المسارات lanes: 8, 14, 24.

Figure 2. Electrophoresis of extracted DNA in 1% agarose gel.

Lane M for molecular markers λDNA; lanes 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15 17, 22, 23 for DNA extracts from *B. Bassiana*; lanes 5, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 21 for DNA extracts from *I. farinosa*; lanes 8, 14, 24 for DNA extracts from *L. lecanii*.

التنوع الوراثي للعزلات المدروسة

تم في هذه الدراسة اختبار 24 بادئة عشوائية باستخدام تقنية RAPD التي تعتمد على تفاعل البوليميريز المتسلسل، وذلك للكشف عن التعدد الشكلي بين عزلات تتبع ثلاثة أنواع من الفطور الممرضة للحشرات. وأظهرت نتائج الإكثار أن أربع بادئات فقط (P793، OPF07، OPF01، P786) قد أعطت تعدداً شكلياً واضحاً بين 20 عزلة من العزلات المدروسة، واستبعدت أربعة عزلات من التحليل لعدم إعطائها نتائج مكاثرة واضحة لأسباب تقنية. استخدمت قيم المصفوفة التي تمت قراءتها من بيانات الاختبار في رسم شجرة القرابة وحساب نسب التشابه بين العزلات المدروسة. في حين لم تعط البادئات الباقية نتائج واضحة من حيث مكاثرة الـ د ن ا المستهدف أو إظهار تعدد شكلي بين العزلات المدروسة.

بلغ المجموع الكلي للحزم الناتجة 288 حزمة (أو عصابة)، نتجت عن استخدام 4 بادئات، وذلك بمعدل 72 حزمة لكل بادئة. نتج العدد الأعظم من الحزم والذي بلغ تعداده 11 حزمة عن البادئة P793، في حين كان تعداد الحد الأدنى من الحزم هو 8 حزم وذلك عند استخدام البادئتين OPF-01 و OPF-07. تراوح حجم القطع المكاثرة بين 200 و 1400 زوج نكليوتيدي (bp)، ويظهر الشكل 3 نتائج عملية المكاثرة عند استخدام البادئة OPF-01.

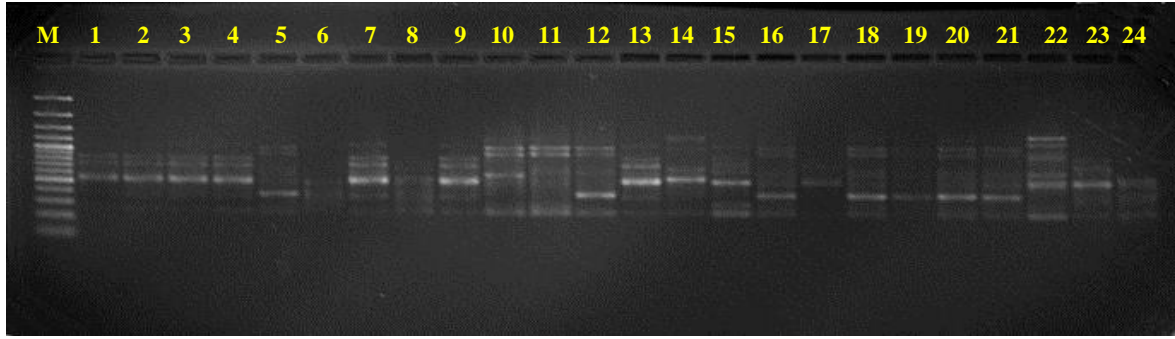
أظهر التحليل العنقودي (cluster analysis) الذي تم رسمه وفقاً لمعامل Jaccard، وبالاعتماد على نتائج المكاثرة بتقنية RAPD أن العزلات العشرين المختبرة توزعت في عنقودين رئيسيين بنسبة تشابه أقل من 25% (شكل 4). ضم العنقود الأول جميع العزلات التابعة للفطر *Isaria*، في حين ضم العنقود الثاني تحت عنقودين احتوى الأول جميع عزلات الفطر *Beauveria*، بينما ضم تحت العنقود الثاني عزلات الفطر *Lecanicillium*. تجدر الإشارة هنا إلى أن المؤشرات الجزيئية المستخدمة لم تستطع عنقدة (clustering) العزلات المدروسة تبعاً لمنطقة الانتشار الجغرافي.

تم الحصول على مجال من التشابه بين العزلات وفق معامل Jaccard في حدود 6-100، 18-86، 17-56% بالنسبة لعزلات الفطور *Beauveria*، *Isaria*، *Lecanicillium*، على التوالي، مما عكس تبايناً وراثياً كبيراً بين العزلات المدروسة لكل نوع من الفطور المدروسة.

أظهرت نتائج العنقدة انعزال الفطور المدروسة تبعاً لنوع الفطر وقد كان المؤشر الجزيئي P793 أكثر المؤشرات قدرة على التمييز بين الأنواع المدروسة حيث أعطى حزمًا/عصابات متباينة.

عملياً لا توجد طريقة واحدة لاستخلاص الـ د ن ا من الكائنات الحية بما فيها الفطور، لذلك يعمل الباحثون بشكل مستمر على تطوير بروتوكولات مناسبة لعملية الاستخلاص، وتستخدم نوعية الـ د ن ا المستخلص ونقاوته وتركيزه كمعغيرات للمقارنة بين الطرائق المختلفة. كما تستفيد الشركات العاملة في هذا المجال من هذه الدراسات في تحضير مجموعات جاهزة (kits) يتم تسويقها بشكل تجاري لهذا الغرض. التحدي الأساسي في عملية استخلاص الـ د ن ا بكمية كافية ونوعية جيدة هو تحطيم الجدر الخلوية التي تعد عائقاً أمام تحرير محتويات الخلية والنواة الحاوية على المادة الوراثية (11). تتمثل الصعوبة في عملية استخلاص الـ د ن ا من الفطور بسبب محتواها المرتفع من عديد السكريات polysaccharide (25). يعد النيتروجين السائل المادة الأكثر استخداماً في تقسية الأنسجة لتسهيل عملية طحنها باستخدام الهاون والمحافظة على سلامة الـ د ن ا من نشاط أنزيمات القطع. عند مقارنة استخدام مواد كيميائية وإنزيمات وطرق ميكانيكية في حل الجدر الخلوية لبعض الفطور الممرضة للحشرات أظهرت النتائج أن استخدام طريقة التجفيد ومن ثم الطحن للميسيليوم في جهاز طحن العينات، والمعاملة بحمض كلور الماء (1N) قد أدت إلى تحلل الجدر الخلوية لهذه الفطور بنسبة 100%، في حين لم تتجاوز نسبة تحلل الجدر بالنسبة لباقي الطرق أكثر من 50% (2). أجريت أيضاً أبحاث في الآونة الأخيرة تم من خلالها استخلاص الـ د ن ا من أنواع مختلفة من الفطور بطحن الميسيليوم بشكل مباشر في محلول الاستخلاص المسخن حتى حرارة 60 °س والحاوي على المادة (SDS) Sodium Dodecyl Sulfate بتركيز 2%، وذلك من كمية 50 مغ ميسيليوم من فطر *Fusarium* و *Verticillium* و *Breda de* و *Rhizoctonia solani* Kühn و Haan Shoemaker، وقد وصلت كمية الـ د ن ا المستخلص في حدها الأعظمي إلى 9091 نانوغرام/ميكرو لتر (12).

على نحو مشابه استطاع عامر وآخرون (3) استخلاص الـ د ن ا بطريقة سريعة تعتمد على الطحن المباشر للميسيليوم في محلول الاستخلاص الحاوي على SDS بنسبة 0.5% من فطور *Rhizoctonia* sp. و *Fusarium solani* (Mart.) Appel & *Wollenw* و *Trichoderma* و *Aspergillus* و *Uloclodium* و *Penicillium*، ودون الحاجة لاستخدام النيتروجين السائل أو المواد الكيميائية الخطرة مثل الفينول والكلوروفورم. أخيراً تم في جميع الطرائق السابقة التأكد من صلاحية الـ د ن ا للعمل باستخدامه في تفاعل البوليمراز المتسلسل للتأكد من خلوه من الملوثات.



شكل 3. مثال عن نموذج الحزم/العصابات التي تم الحصول عليها في اختبار RAPD على 24 عزلة من الفطور الممرضة للحشرات باستخدام البادنة OPF-01.
 المسار M: مؤشر قياسي 100 زوج نكليوتيدي - base pair: *B. bassiana* - المسارات lanes 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 17, 22, 23 - *I. farinosa*: المسارات lanes: 5, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 21 - *L. lecanii*: المسارات lanes: 8, 14, 24.

Figure 3. Example of RAPD banding pattern obtained for 24 isolates of entomopathogenic fungi using the primer OPF-01. Lane M for molecular ladder of 100 bp; lanes 1, 2, 3, 4, 9, 13, 15, 17, 22, 23 for DNA extracts from *B. Bassiana*; lanes 5, 6, 7, 10, 11, 12, 16, 18, 19, 20, 21 for DNA extracts from *I. farinosa*; lanes 8, 14, 24 for DNA extracts from *L. lecanii*.

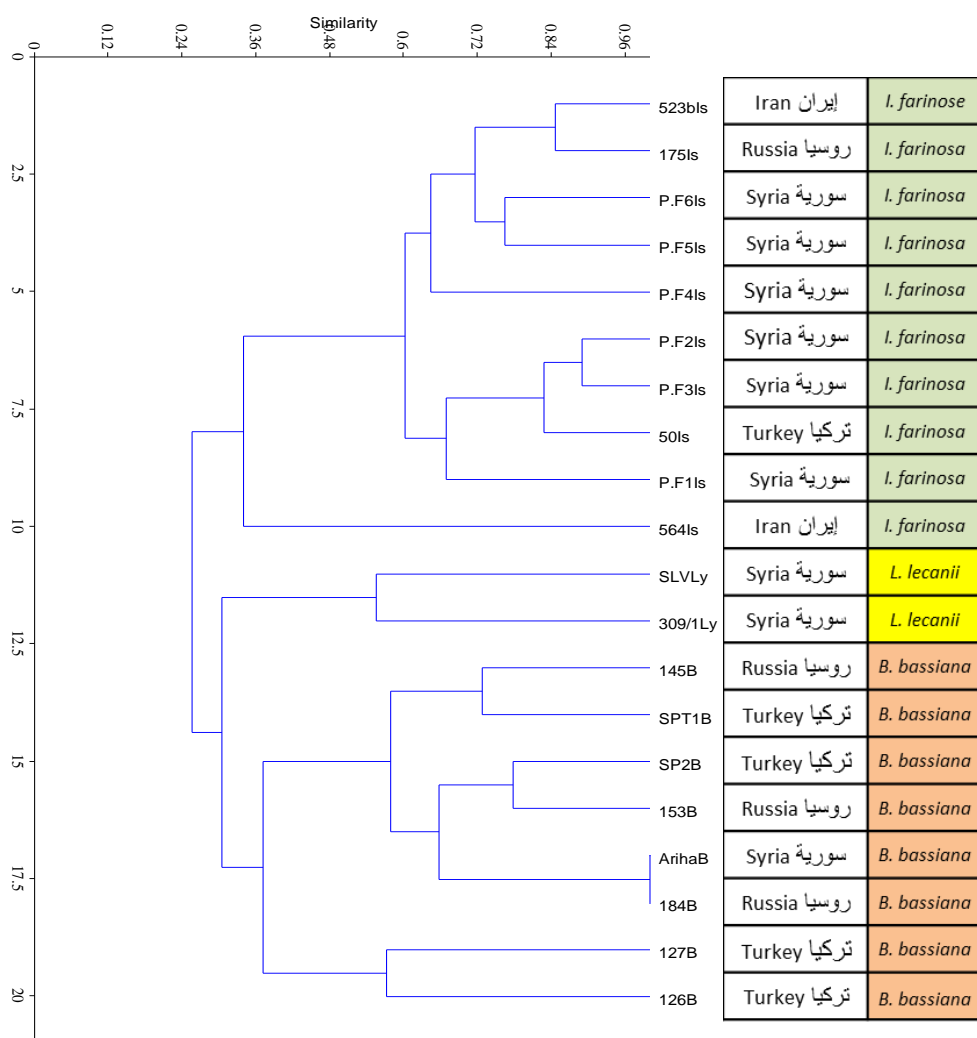
توزع العزلات تبعاً للعائل الذي تم الجمع منه، حيث لوحظت مجموعات واضحة لعزلات جمعت من حرشفية الأجنحة وغمدية الأجنحة (21).
 بينما قام Buckley و Rehner (17) بجمع عزلات للفطر *Beauveria* spp. في الدانمارك واستطاع من خلالها تصنيف الفطر *B. bassiana* إلى تحت مجموعات تبعاً لمنطقة الانتشار الجغرافي مثل المجموعة NA-1 في أمريكا الشمالية و EU-1 في أوروبا. أما في تشيلي فقد استخدمت ثلاث تقنيات جزيئية هي ITS، SSR، RAPD في دراسة الاختلافات الوراثية ضمن النوع *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*، حيث تم دراسة 39 عزلة تم جمعها من مناطق جغرافية مختلفة. وأظهرت تقنية RAPD تنوعاً وراثياً كبيراً في هذا الفطر حيث بلغت نسبة التشابه 41%، بينما كانت النسبة 45.2% عند استخدام تقنية SSR، و 71.2% عند استخدام مؤشرات ITS، لكن لم يكن هناك ارتباط بين التنوع الوراثي ومنطقة الانتشار الجغرافي عند استخدام المؤشرات الجزيئية الثلاثة (22).

في البرازيل قام Fernandes وآخرون (10) باستخدام تقنية AFLP لدراسة التنوع الوراثي بين عزلات الفطر *B. bassiana* حيث أظهرت عدة عزلات من جنوب وجنوب شرق البرازيل معامل تشابه كبير فيما بينها، مما يشير إلى أنها تعود إلى مجتمع للفطر من مستعمرة واحدة. في حين كانت هناك اختلافات وراثية فيما بينها وبين عزلات تم جمعها من الولايات المتحدة واستنتج الباحث بموجبها أن البعد الجغرافي بين مجتمعات الفطر هو عامل مهم ومؤثر في التغيرات الوراثية بين مجتمعات الفطر *B. bassiana* في البرازيل.

في حين لم تتعزل هذه العزلات تبعاً لنوع العائل المدروس على اعتبار أن كل العزلات (باستثناء العزلتين 418 و SLV) اللتين عزلتا من الجعالات وسوسة النخيل، على التوالي. كما لم تظهر شجرة القرابة توزع العزلات تبعاً للموقع الجغرافي الذي جمعت منه، حيث أظهرت العزلتان Ariha (سورية) و 184 (روسيا) تطابقاً في النمط الوراثي فيما بينهما رغم أنهما من مصدرين مختلفين.

تم جمع معظم عزلات الفطر *Isaria* من سورية وقد أظهرت تبايناً وراثياً فيما بينها حيث بلغت نسبة التشابه ما بين العزلات 48-75%، وقد تكون هذه الاختلافات مرتبطة مع القدرة الإمراضية للفطر، الأمر الذي يستدعي دراسة القدرة الإمراضية لعزلات الفطر المجموعة من سورية باعتبارها متكيفة مع الظروف المحلية ويمكن استخدامها في برامج مكافحة. في حين بلغت نسبة التشابه بين العزلتين SLVL4 و 309/1 حوالي 56% وهما عزلتان تم جمعهما من عائلين مختلفين هما سوسة النخيل والسونة ومن منطقتين مختلفتين اللاذقية وحلب، على التوالي.

استخدمت المؤشرات الجزيئية المختلفة في دراسة التنوع الوراثي للفطور الممرضة للحشرات في العديد من البلدان حول العالم. تم العمل في الهند على 48 عزلة من العزلات الداخلية للفطر *B. bassiana* تم جمعها من عوائل وسط الهند باستخدام تقنية RAPD. أظهرت النتائج مستوى عالٍ من التنوع الوراثي حيث كانت الاختلافات الوراثية بين العزلات من 0-66%، وأظهر معامل Jaccard مجالاً واسعاً للتشابه تراوح ما بين 25 و 100%، كما أظهرت شجرة القرابة التي تم رسمها



شكل 4. شجرة القرابة dendrogram بين الفطور المدروسة وفق معامل Jaccard وبالاعتماد على مؤشرات الـRAPD. **Figure 4.** Dendrogram constructed from analysis of DNA fragments of 24 isolates of the tested three entomopathogenic fungi species amplified with RAPD according to Jaccard similarity coefficient

الفطر محور الدراسة، والخمس الأخرى كان توزيعها تبعاً للعائل الذي عزلت منه. بينما في الدراسة التي أجريت في سورية على عزلات للفطر *B. bassiana* تم جمعها من سورية وتركيا، فقد أظهرت نتائج تحليل AFLP وجود تباين وراثي بين العزلات الصيفية والشتوية، كما توزعت العزلات تبعاً لمنطقة الانتشار الجغرافي (1).

وأخيراً أظهرت هذه الدراسة وجود تنوع وراثي ما بين العزلات التي تم جمعها لثلاثة أنواع من الفطور الممرضة للحشرات وذلك عند استخدام المؤشر الجزيئي RAPD، ونوصي باستخدام مؤشرات جزيئية أخرى في دراسة هذه الفطور ومقارنة نتائجها مع هذه التقنية مما يساهم في رسم صورة أوضح حول المكون الوراثي لهذه الفطور وتوثيقها بشكل جزيئي من حيث شراستها وإمكانية تتبعها بعد إطلاقها في الحقل، ومراقبة التغيرات التي يمكن أن تطرأ عليها عند استخدامها كمستحضرات تجارية في عملية مكافحة الحيوية.

أما في تركيا فقد تم من خلال تقنية AFLP فصل عزلات الفطرين *B. bassiana* و *M. anisopliae* var. *anisopliae* ضمن 3 و 4 مجموعات، على التوالي، وقد تم الكشف عن وجود تنوع وراثي لهذه العزلات في منطقة الدراسة (شرق البحر الأسود)، وقد توزعت عزلات الفطر *B. bassiana* تبعاً للمنطقة الجغرافية لكنها لم تنتزع تبعاً للموطن الذي تم الجمع منه (بيئة زراعية أو غير زراعية)، في حين لم يكن هناك ارتباط بين عزلات الفطر *M. anisopliae* var. *anisopliae* والموقع الجغرافي أو الموطن (19).

أما في الاكوادور فقد قام Arahana و Bastidas (4) بدراسة 41 عزلة باستخدام تقنية AFLP تتبع عدة أجناس من الفطور الممرضة *Metarhizium* sp. و *B. Brongniarti* (Saccardo) Petch حيث *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* و *Beauveria* sp. توزعت العزلات ضمن 12 مجموعة، سبع منها توزعت تبعاً لجنس

Abstract

Khatib, F., A. Karkoukly, A.N. Trisi and M. El-Bouhssini. 2016. Genetic diversity of some isolates of entomopathogenic fungi collected from different regions. Arab Journal of Plant Protection, 34(1): 52-61.

Assessment of the genetic variability of entomopathogenic fungi (EPF) is useful for the development of effective biocontrol strategies. In this study, 24 isolates, derived from three species of EPF were collected from different geographical regions, approximately half of them from Syria. Initially, the DNA was extracted from the fresh mycelium following CTAB procedures. DNA concentration and purity were tested using the UV absorbance values at 260 and 280 nm. Furthermore, the integrity of the extracted DNA was tested in 1% agarose gel. Twenty four RAPD primers were applied for studying the genetic diversity. High DNA concentrations were extracted (3.2 µg/µl from *B. bassiana*, and 2.9 µg/µl from *I. farinosa* and *L. lecanii*) with UV 260/280 absorbency ratio of 1.7 for all tested isolates. Four RAPD primers revealed polymorphism and separated the isolates according to the fungus species into two main clusters. The first cluster included *Isaria* isolates and the second one contained two groups, one for *Beauveria* and the second for *Lecanicillium*. Banding pattern of P793 marker showed high efficiency in distinguishing the fungi species in contrast to other markers. Genetic diversity was not associated with geographic location. RAPD analysis revealed the presence of high level of genetic diversity between the tested isolates. The sets of amplified bands showing identical pattern to others were grouped at 100% similarity level. A wide range (6 -100%, 18-86% and 17-56%) of Jaccard similarity coefficient was observed among the isolates of *B. bassiana*, *I. farinosa* and *L. lecanii*, respectively.

Keywords: DNA extraction, polymorphism, molecular markers, RAPD.

Corresponding author: Abdul Nasser Trissi, Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria, email: n_trissi@yahoo.com

References

- Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.)". Letters in Applied Microbiology, 25: 289-294.
9. **deMuro, M.A., S. Mehta and D. Moore.** 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. FEMS Microbiology Letters, 229: 249-257.
 10. **Fernandes, E.K.K., A.M.L. Moraes, R.S. Pacheco, D.E.N. Rangel, M.P. Miller, V.R.E.P. Bittencourt and D.W. Reberts.** 2009. Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. Journal of Applied Microbiology, 107: 760-774.
 11. **Fredricks, D.N., C. Smith and A. Meier.** 2005. Comparison of Six DNA Extraction Methods for Recovery of Fungal DNA as Assessed by Quantitative PCR. Journal of Clinical Microbiology, 43: 5122-5128.
 12. **Karthikeyan V., S. Patharajan, P. Polani, D. Spadaro, M.L. Gullino and A. Garibaldi.** 2010. Modified simple Protocol for Efficient Fungal DNA Extraction Highly suitable for PCR Based Methods. Global Journal of Molecular Sciences, 5: 37-42.
 13. **Lübeck, M., I.A. Alekhina, P.S. Lübeck, D.F. Jensen and S.A. Bulat.** 1999. Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridization. Mycological Research, 103: 289-298.
 14. **Mitina, G., L. Mikhailova and T. Yli-Mattila.** 2008. RAPD-PCR, UP-PCR and rDNA sequence analyses of the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii* and its pathogenicity towards insects and phytopathogenic fungi. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 41: 113-128.
 1. **تريسي، عبد الناصر.** 2010. تأثير الجرعات تحت القاتلة من بعض عزلات الفطر *Beauveria bassiana* في نمو وتطور مجتمع آفة السونة وتحديد الصفات الجزيئية لعزلات الممرض. رسالة دكتوراه، جامعة حلب، سورية. 170 صفحة.
 2. **خطيب فاتح، تريسي عبد الناصر كركوكلي أحمد المهدي** 2015. مقارنة ثلاث طرائق لاستخلاص الـ DNA من الفطور الممرضة للحشرات، مجلة بحوث جامعة حلب، 116: (قيد النشر).
 3. **Amer, O. E., M.A. Mahmoud, A.M.A. El-Samawaty and S.R.M. Sayed.** 2011. Non liquid nitrogen-based-method for isolation of DNA from filamentous fungi. African Journal of Biotechnology, 10: 14337-14341.
 4. **Arahana, V., N. Bastidas, M. de Lourdes and P. González.** 2013. Genetic diversity of an entomopathogenic fungi collection from Ecuador using a modified AFLP approach. Advances, 5: B49-B57.
 5. **Bidochka, M.J., A.M. Kamp, T.M. Lavender, J. Dekoning and J.N.A. De Croos.** 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: Uncovering cryptic species. Applied and Environmental Microbiology, 67: 1335-1342.
 6. **Bullat, S.A., M. Lübeck, I.A. Alekhina, D.F. Jensen, I.M.B. Knudsen and P.S. Lübeck.** 2000. Identification of a universally primed-PCR-derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4758-4763.
 7. **Bullat, S.A., M. Lübeck, N. Mironenko, D.F. Jensen and P.S. Lübeck.** 1998. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium*. Mycological Research, 102: 933-943.
 8. **Cravanzola, F., P. Piatii, P. Bridge and O. Ozino.** 1997. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus

المراجع

- Beauveria bassiana* of Central India. *Biocontrol Science and Technology*, 15: 733-744.
22. **Velásquez, V.B., M.P. Cárcamo, C.R. Meriño, A.F. Iglesias and J.F. Durán.** 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*, 30: 89-99.
 23. **Wang, C., M. Fan, Z. Li and T. M. Butt.** 2004. Molecular monitoring and evaluation of the application of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* in southeast China, *Journal of Applied Microbiology*, 96: 861-870.
 24. **Zengzhi, L., S. Alves, D. Roberts, F. Meizhen Jr., I. Delalibera, L. Jian-Tang, B. Rogério, M. Faria and D. Rangel.** 2010. Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology*, 20: 117-136.
 25. **Zhang, D., Y. Yang, L.A. Castlbury and C.E. Cerniglia.** 1996. A method for large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA. *FEMS Microbiological Letters*, 145: 261-265.
 26. **Zimmermann, G.** 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniarti*. *Biocontrol Science and Technology*, 17: 553-596.
 27. **Zimmermann, G.** 2008. The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces farinosus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 865-901.
 15. **Neuhauser, S., L. Huber and M. Kirchmair.** 2009. A DNA based method to detect the grapevine root-rotting fungus *Roesleria subterranea* in soil and root samples. *Phytopathologia Mediterranea*, 48: 59-72.
 16. **Poprawski, T., G. Riba, W. Jones and A. Aioun.** 1989. Variation in isoesterase profiles of geographical populations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolated from *Sitona* weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology*, 17: 275-279.
 17. **Rehner, S.A. and E. Buckley.** 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*, 97: 84-98.
 18. **Sambrook, J. and D. W. Russel.** 2001. Rapid isolation of yeast DNA. Pages 631-632. In: *Molecular cloning, a laboratory manual*. J. Sambrook and D.W. Russel (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
 19. **Sevim, A., M. Höfte and Z. Demirbağ.** 2012. Genetic variability of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* isolates obtained from the Eastern Black Sea Region of Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 36: 255-265.
 20. **Takatsuka, J.** 2007. Characterization of *Beauveria bassiana* isolates from Japan using inter-simple sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Applied Entomology and Zoology*, 42: 563-571.
 21. **Thakur, R., R.C. Rajak and S.S. Sandhu.** 2005. Biochemical and molecular characteristics of indigenous strains of the entomopathogenic fungus

Received: July 22, 2015; Accepted: November 17, 2015

تاريخ الاستلام: 2015/7/22؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2015/11/17