MOLECULAR STUDIES ON THE PRIME MECHANISMS OF INDUCED RESISTANCE IN CERTAIN ECONOMICAL CROPS IN EGYPT

ATTIA AHMED ATTIA IBRAHIM

استهدفت هذه الدراسة الكشف عن الميكانيكيات الأولية لاستحداث المقاومة فى نباتى الفاصوليا وفول الصويا لثلاث فطريات هم: فطرة "فيوزاريم سولاناى. فاسيولاى" وفطرة "فيوزاريم سولاناى. جليسين" (المسببين لمرض تعفن الجذور والسويقة الجنينية السفلى فى نباتى الفاصوليا وفول الصويا على التوالى). وكذلك تم دراسة الميكانيكيات الأولية لاستحداث المقاومة ضد فطرة "كوليتوتريكم ليندمثيانم" بغرض المقارنة فقط. ولقد تضمنت هذه الدراسة النقاط التالية:أولاً: تنمية الفطريات على ثلاث بيئات مختلفة لمدة من 10-7 أيام حيث أظهر كلاً من "فيوزاريم سولاناى. فاسيولاى" و "فيوزاريم سولاناى. جليسين" أفضل نمو عند 30م على بيئة مستخلص البطاطس (PDA) بينما أظهر فطرة "كوليتوتريكم ليندمثيانم" أفضل نمو عند 20 م على نفس البيئة.- تم تنبيت بذور النباتات محل الدراسة فى صناديق بلاستيك معقمة وتم توفير الرطوبة اللازمة وزراعة البذور المنبتة فى تربة رملية معقمة تحت ظروف درجة حرارة وإضاءة المعمل.ثانياً: تم دراسة المقاومة الطبيعية (غير المستحدثة) لأصناف مختلفة من الفاصوليا وفول الصويا ضد الفطريات محل الدراسة وذلك بتلقيح السويقات الجنينية السفلى المقطوعة من نباتات الفاصوليا وفول الصويا بقطرات من المعلق الجرثومى للفطرة ثم تحضينها عند 20 م بالنسبة للفاصوليا وعند 30 م بالنسبة لفول الصويا.- تم اختيار الصنف الأكثر مقاومة للمرض والصنف الأكثر قابلية للإصابة المرضية لكل من نباتى الفاصوليا وفول الصويا لاستكمال الدراسة عليها وهما صنفى نبراسكا وبرونكو وصنفى كروفورد وجيزة 22 على التوالى. وجدير بالذكر أن الأصناف محل الدراسة جميعها درست لأول مرة فيما عدا صنف كراوفورد (فول الصويا).- تم دراسة مقاومة الأصناف المختارة لفطرة "فيوزاريم سولاناً.فاسيولاى" تحت ظروف النباتات النامية عند درجة حرارة الغرفة (30-25 م) والسويقات الجنينية السفلى المقطوعة وذلك بحقنها بالمعلق الجرثومى للفطرة ذو التركيز 1 × 10 6 جرثومة / مليلتر وذلك عند درجتى الحرارة 20، 30م. وتم مقارنة تفاعل قرون صنفى نبات الفاصوليا محل الدراسة،وتم دراسة مقاومة صنفى نبات فول الصويا محل الاختبار مع ملاحظة درجة الحرارة الملائمة لنمو فول الصويا (30 م)0- أظهرت الدراسة قابلية كل الأصناف للإصابة بالمرض فيما عدا صنف نبراسكا حيث أظهر درجة من المقاومة وكذلك صنف كروفورد أظهر درجة متوسطة من التفاعل تميل إلى الإصابة بالمرض أكثر من ميلها إلى المقاومة.ثالثاً: تم دراسة المقاومة المستحدثة للأصناف المختارة من الفاصوليا وفول الصويا عند درجات الحرارة 20، 25، 30، 35 م وذلك باستخدام فطرة فيوزاريم معزولة من نبات البطاطس كبادئ لاستحداث المقاومة حيث تم تلقيح السويقات الجنينية السفلى المقطوعة بقطرات من المعلق الجرثومى لهذه العزلة لمدة 4 ساعات عند درجات حرارة التحضين المذكورة ثم الإصابة بالفطريات محل الدراسة.- تم ملاحظة الأعراض المورفولوجية على مدار مراحل الإصابة بدءًا من الإصابة حتى ظهور الأعراض (خلال الفترة من صفر -48 ساعة).- تم الفحص المجهرى للتفاعلات بين العائل والطفيل فى كلا تفاعلى الإصابة والمقاومة المستحدثة فى الأنظمة محل الدراسة.- اختبار القدرة على إحداث الإصابة للفطريات محل الدراسة أظهر أن عزلات الفطريات محل الدراسة التى تم عزلها من أنسجة العائل تسلك نفس سلوك العزلات الأصلية لهذه الفطريات وأن جميع الأصناف محل الدراسة أكثر مقاومة للمرض عند درجة حرارة 20 م فيما عدا صنف جيزة 22 الذى أظهر قابلية للإصابة بينما عند درجة حرارة 25 م صنفى نبراسكا وكروفورد من نباتى الفاصوليا وفول الصويا على التوالى أظهرا مقاومتهما للإصابة المرضية بينما صنفى برونكو وجيزة 22

فأظهرا قابليتهما للإصابة المرضية ولكن عند 30 □م فقد أظهرا الصنفان نبراسكا وكروفورد درجة متوسطة من المقاومة أما الصنفان برنكو وجيزة 22 كانا أكثر قابلية للإصابة المرضية بينما عند درجة حرارة 35 □م فكانت جميع الأصناف محل الدراسة قابلة للإصابة المرضية.رابعاً: تم عزل الفيتوأليكسن (المركبات الفينولية الثانوية) خاصة الفيتوأليكسن "الفسيولين" من مستخلص السويقات الجنينية السفلى لنباتات الفاصوليا السليمة والمستحثة بعزلة فطرة فيوزاريم الغير ممرض (الممرض للبطاطس). أما من نبات فول الصويا فقد تم عزل الفيتوأليكسن "الجليسولين".- تم فصل وتحليل هذه المركبات باستخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافيا باستخدام السوائل ذات الضغط العالى (HPLC).- أظهرت النتائج أن المقاومة المستحدثة تميزت بزيادة فى تركيز الفيتوأليكسن فى الأصناف المستحثة محل الدراسة مقارنة بالأصناف السليمة لكلا من نباتى الفاصوليا وفول الصويا مما يشير إلى دور عزلة فطرة فيوزاريم المعزولة من البطاطس فى استحداث المقاومة فى نباتى الفاصوليا وفول الصويا من خلال تنشيط إنتاج هذه المركبات.خامساً: تم تحليل البروتينات لأصناف الفاصوليا وفول الصويا السليمة والمستحثة باستخدام تحليل التفريد الكهربى للبروتينات (الإلكتروفوريسيس) وعليه اتضح ما يلى:وجود أحزمة بروتينات مميزة للأصناف المستحثة لعدم وجودها فى الأصناف السليمة.- أيضا تم تحليل البروتينات للفطريات محل الدراسة سواء الأصلية والمعزولة من أنسجة النبات محل الدراسة وأوضحت النتائج وجود بروتينات جديدة فى العزلات المعزولة مما يدل على أن هذه البروتينات الجديدة لها ارتباط بالتفاعلات التى تحدث بين العائل والطفيل.سادساً: تم تحليل الأيزوزيم "بيروكسيديز" لأصناف الفاصوليا وفول الصويا السليمة وكذلك على هيئة الأنظمة التالية:- الأصناف المعاملة (المحقونة) فقط بالفطر الممرض (أى الأصناف القابلة للإصابة المرضية).- الأصناف المعاملة (المحقونة) فقط بالفطر الغير ممرض.- الأصناف المستحثة أى المعاملة (المحقونة) بكل من الفطر الممرض والغير ممرض كل على حدة وذلك باستخدام تحليل التفريد الكهربى PAGE-SDS- أظهرت النتائج وجود باندات من عائلة البيروكسيديز فى الأصناف المصابة فقط بالفطر الغير ممرض غير موجودة فى نفس الأصناف السليمة وكذلك وجود باندات فى الأصناف المستحثة وغير موجودة بالأصناف القابلة للإصابة المرضية مما يدل على دور الفطر الغير ممرض فى استحداث المقاومة فى نباتى الفاصوليا وفول الصويا عن طريق تحفيز انتاج البيروكسيديز وذلك خلال فترة الـ24 ساعة من الإصابة.سابعاً: تم التمييز على مستوى الحامض النووى (DNA) للأصناف المستحثة لنباتات الفاصوليا وفول الصويا المختبرة مقارنة بالسليمة.- تم التمييز على مستوى الحامض النووى (DNA) لكل من عزلات الفطريات الممرضة الأصلية والمعزولة من أنسجة النباتات محل الدراسة.- تم عمل البصمة الجزيئية للحامض النووى عن طريق إجراء تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) باستخدام تتابع عشوائى لثلاث نيوكليوتيدات للحامض النووى (وبرونكو نراسكا صنفى) بالفاصوليا الخاص DNA من جزء 31 فصل النتائج أظهرت(RAPD Primers) للثلاثة تتابعات النيوكليوتيدية 6 أجزاء فيها متشابهة وموجودة فى كل من الأصناف السليمة والمستحثة و7 أجزاء منها تميز صنف نبراسكا المستحث، بينما الصنف برونكو المستحث فظهر به 3 أجزاء تميزه عن باقى الأصناف السليمة والمستحثة.بالنسبة لفول الصويا فقد تم فصل 44 جزء من DNA الخاص بصنفى كروفورد وجيزة 22 منها 6 أجزاء متشابهة وتوجد فى كل من الأصناف السليمة والمستحثة و3 أجزاء تميز صنف كروفورد المستحث و9 أجزاء تميز صنف جيزة 22 المستحث عن باقى الأصناف السليمة والمستحثة مما يشير إلى إمكانية استخدام هذه التقنية لتطوير أدلة جزيئية يمكن استخدامها للتمييز بين الأصناف وبعضها.أظهرت النتائج أيضا فصل 30 جزء من DNA الخاص بفطرة "فيوزاريم سولاناى. فاسيولاى" (العزلة الأصلية والعزلة المعزولة من أنسجة النبات محل الدراسة) منها 9 أجزاء متشابهة وموجودة فى كل من العزلتين و 21 جزء مختلف منها 15 جزء يميز العزلة الأصلية قبل الحقن فى أنسجة العائل و 6 أجزاء تميز العزلة التى تم عزلها من أنسجة النباتات محل الدراسة.