

تحليل التسلسل الجيني بواسطة تقنية (NGS) كمنهج شامل لتشخيص أمراض النباتات البكتيرية

إعداد: سامح ناجي أحمد أبو الرب

إشراف: د. إبراهيم العباسي

ملخص

تعتبر ثمرة البندورة (*Solanum lycopersicum*) واحدة من أهم الخضروات المطلوبة في العالم، مع ناتج سنوي عالمي يزيد عن 100 مليون طن. حيث يتأثر إنتاج ثمرة البندورة بعدوى ذات أصول بكتيرية وفطرية من أهمها مرض ناتج عن بكتيريا رائدة تسببها (*Ralstonia solanacearum*) يعرف باسم ذبول البندوره. الهدف الرئيسي من الدراسة الحالية هو فحص ومراقبة وفرة الميكروبات والكائنات الدقيقة في التربة والأجزاء النباتية التي تم جمعها من الدفيئات الخاصة بزراعة البندورة. حيث استندت طريقة البحث على تحديد ومتابعة التواجد البكتيري والفطري وذلك باستخدام طريقة الجيل التالي من تحديد تسلسل الحمض النووي عالي الإنتاجية (NGS). هذه الطريقة هي تقنية جديدة نسبياً تسمح بتحديد شامل لتسلسل للحمض النووي وتمكن من إنتاج مجموعة واسعة من المعلومات الوراثية من العديد من الكائنات الحية بشكل متوازي وتوفر قياساً كمياً منفصلاً لكل عنصر من أجزاء DNA المتسلسلة. حيث تم استخدام بادئات عامة لزيادة أعداد مقاطع جينات 16S rRNA لأنواع البكتيرية ومنطقة ITS من مسببات الأمراض الفطرية ولاحقاً تم تحديد تسلسل الأحماض النووية لهذه المقاطع بواسطة تكنولوجيا NGS.

تمت هذه الدراسة بعد جمع عينات من نبتة البندوره وعينات تربة من 7 دفيئات مختلفة في مدينة جنين خلال فترة أربعة أشهر (من أكتوبر 2017 إلى أواخر ديسمبر 2017). خلال هذه الفترة تم إجراء ما مجموعه 6 زيارات لجمع العينات حيث تم جمع 3 عينات من النباتات و 3 عينات من التربة في كل زيارة. في نهاية فترة جمع العينات تم جمع 252 عينة من التربة والنباتات. وبعد ذلك تم استخراج الحمض النووي العينات، ومن ثم مضاعفة مقاطع محددة من الجينات خاصة بالبكتيريا وأخرى خاصة بالفطريات. وبعد ذلك تم تحليل تسلسل الحمض النووي بموائمة طرق مستخدمه ضمن إستراتيجيات شركة Illumina MiSeq لتحليل الحمض النووي. لقد تم تجميع 252 عينة وفقاً لطبيعة العينات، ورقم الدفيئة ووقت الزيارة لتشكيل 85 عينة شكلت MiSeq library. لاحقاً وبعد التحليل تم إنتاج ما مجموعه 170 ملف FASTQ يتكون من قراءة 1 وقراءة 2 لكل عينة فردية. تم تحميل جميع الملفات على برنامج (Galaxy) لتحليل ملفات

FASTQ/NGS. وبعد فحوصات الجودة لهذه القراءات تم تطبيق سير عمل لتحليل التسلسل يستند إلى طول التسلسل واختيار سلاسل فريدة من الفطريات على العينات التي تم تحليلها بعد دمج القراءة 1 مع القراءة 2 ذات الصلة من كل مقطع تم تحليله.

تمكنا في هذه الدراسة من تحديد أنواع الميكروبات المسببة للأمراض النباتية من خلال مقارنة التسلسل الجيني من للعينات الدراسة بالتسلسلات الجينية المرجعية في قاعدة بيانات بنك الجينات، وأهم الأجناس التي تم تحديدها هي (*Ralstonia*, *Erwina*, *Pseudomonas*, (*Stenotrophomonas*, and *Achromobacter*). حيث أن هذه الأنواع هي من أصل التربة وتسبب أمراض مختلفة في نبات البندورة، والأكثر أهمية هو الأنواع البكتيرية من جنس *Ralstonia* التي تسبب مرض الذبول. كانت البادئات المستخدمة لتحديد هوية الفطريات أقل نجاحا وتم الحصول على عدد أقل من القراءات. وقد كانت فطريات الممرضه النباتية الرئيسية التي تم تحديدها في كل من التربة والأوراق النباتية هي *Alternaria tenuissima* ، مع بعض الأنواع الأخرى من الفطريات الممرضة للنباتات مثل (*Candida sake*, *Yarrowia lipolytica*, (*Wickerhamiella pararugosa*)

تمت مناقشة أدلة مختلفة تدعم افتراض أن التربة مصدر للعدوى حيث أن العديد من العوامل الممرضة المحددة هي من أصل التربة وكان هناك نوع من الارتباط بين العثور على المجموع البكتيري في عينات النباتات والتربة.