----- مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 225-235، 2006-----

وراثة المقاومة للمبيد الفطري في الفطر *Aspergillus amstelodami* Hymexazol

ساهي جواد ضاحي فادية موفق الحيالي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/9/20 ؛ تاريخ القبول 2005/12/5)

الملخص

جرى عزل 84 طافرة مقاومة للمبيد الفطري تشجازول (Hymexazol) من السلالتين الابويتين A76 (*bwA nicA*) ذات الكونيدات البنية والحاجة الغذائية لفيتامين حامض النيكوتينك و AZG131 (*lysA azgA wA*) ذات الكونيدات البيضاء والحاجة الغذائية للحامض الاميني اللايسين والمقاومة للعقار 8-azaguanine من الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami* . وقد أظهرت جميع الطافرات سيادة جزئية على اليلاتها البرية ، وظهر أن جميع هذه الطافرات انما تعود لجين واحد اطلق عليه *hymA* بوصفه اول جين من نوعه يشخص في هذا النوع . وقد أظهرت التحليلات بالتصيف أن هذا الجين لايقع على أي من المجاميع الارتباطية السبع (I-VII) المشخصة في هذا الفطر على الرغم من أن علاقته الارتباطية مع المجموعتين الاخريتين (الثامنة VIII والتاسعة IX) المشخصتين في هذا الفطر لم تجر دراستها لعدم توفر السلالات المرجعية المناسبة في حينها .

Genetics of Resistance to To The Fungicide Hymexazol In *Aspergillus amstelodami*

Sahi J. Dhahi **Fadeya M. Al-Hyaly**

Department of Biology

College of Science

Mosul University

ABSTRACT

A sample of 84 mutants resistant to the fungicide hymexazol were 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 amsteladami*. All mutants exhibited partial dominance to their respective wild type alleles and complementation tests in heterokaryons put them all into a single gene designated *hymA* as the first gene of its kind to be identified in this species. Haploidization analyses failed to locate *hymA* on any of the seven (I-VII) linkage groups recognized in this fungus although its linkage to the other two recognized groups (VIII and IX) was not tested due to inavailability of suitable master strains at the time .

المقدمة

لعبت المبيدات الفطرية (Fungicides) منذ القرن التاسع عشر دورا مهما في السيطرة على الفطريات الممرضة للنبات (العروسي وجماعته ، 2003 ؛ شعبان والملاح ،1993) . وقد ادت النتائج السريعة والتكلفة الزهيدة للمكافحة الكيميائية الى الافراط والعشوائية في استخدام المبيدات ، الأمر الذي انعكس بشكل سلبي من خلال ظهور العديد من السلالات الفطرية المقاومة للمبيدات بشكل عام (2003 ;Kane and Miller, ; Michael et al., 2003 ; Legard , 2002 ; Pillai et al ., 2001 ; العادل وعبد، 1979) .

يهدف البحث الحالي الى عزل طافرات تلقائية ومستحثة مقاومة للمبيد Hymexazol في الفطر الكيسي *Aspergillus amstelodami* بهدف دراسة الاساس الوراثي لهذه المقاومة في هذا الفطر . ورغم ان هذا النوع لا يعد ممرضا نباتيا الا ان فهم الاساس الوراثي لمقاومة هذا المبيد في هذا الفطر قد يلقي الضوء على الاساس الوراثي للمقاومة في الفطريات البيضية (Oomycetes) التي تسبب امراضا خطيرة في العديد من المحاصيل الحقلية (Alexopolous and Mims, 1979) .

المواد وطرائق العمل

السلالات المستخدمة في الدراسة :

استخدمت في هذه الدراسة ثلاث سلالات موثقة من الفطر *A. amstelodami* وهي A76 و AZG131 و A167 ويبين الجدول (1) أصول هذه السلالات وتراكيبها الجينية .

الطرق المايكروبيولوجية والاوساط وظروف الزرع :

ان الطرق المايكروبيولوجية والاوساط الزرعية وظروف الزرع التي استخدمت في البحث هي تلك التي جرى تطويرها سابقا بالتعامل مع هذا الفطر (DeBertoldi and Caten, ; Caten, 1979 1979 ; Dhahi, 1978) ، حيث جرى استخدام وسطين اساسيين هما الوسط الادنى Minimal medium (M) ومشتقاته وكذلك وسط مستخلص الشعير – الملح Malt extract- Salt medium (MTS) ومشتقاته . كان التحضين عند درجة الحرارة المثلى لنمو الفطر 30 مْ .

الجدول 1: مصادر السلالات المستخدمة في الدراسة وتركيبها الجيني

رقم السلالة	التركيب الجيني	المرجع
AZG 131	*AzgA131 lysA wA*	الحمداني (1985)
A76	*nicA bwA*	Induced by UV in A25 (See DeBetoldi and Caten, 1979)
A167	*bwA argA oclA dilA azgA sC proA*	Dhahi (1996)

دليل الرموز الجينية

1- يمثل الرمزان *wA* و *bwA* جينين طافرين مسؤولين عن اللون الكونيدي الأبيض والبني على الترتيب ،المميزين عن اللون الأخضر الزيتوني البري لكونيدات هذا الفطر، في حين أن الرمز الجيني *dilA* يعطي صفة الصبغة المخففة (dilute) لألوان الكونيدات البنية أو الخضراء .

2- يشير الرمز *oclA* إلى الجين المسؤول عن إعطاء اللون البرتقالي للأجسام الثمرية (Cleistothecia) مقارنة بلونها الأصفر البراق في النمط البري .

3- تمثل الرموز الجينية (*argA* ، *lysA* ، *proA*) حاجة الفطر للأحماض الأمينية أرجينين و لايسين و برولين على الترتيب

4- الرمز الجيني *sC* يمثل عدم قدرة الفطر على استعمال الكبريت S اللاعضوي ، لذا لا بد من وجود مصدر عضوي للكبريت كالحامض الاميني ميثايونين .

5- يشير الرمز الجيني *nicA* الى احتياج الفطر لفيتامين حامض النيكوتينك nicotinic acid او النيكوتين امايد nicotinamide .

6- يشير الرمز *azgA* الى مقاومة الفطر للمادة السامة 8-azaguanine (وهي نظير للقاعدة الطبيعية Guanine) (DeBertoldi and Caten, 1979 ; Dhahi and Caten, 1987 ; Clutterbuck, 1973 ; 1974).

عزل الطافرات المقاومة :

جرى اختبار سمية المبيد للسلالتين الابويتين A76 و AZG 131 بتنميتهما على الوسط M الحاوي على تراكيز متصاعدة من المبيد مقدارها 2075، 4150، 6225 و 8300 مايكروغرام/مل . وقد استخدم لهذا الغرض النوع السائل من المبيد والمسوق تجاريا من قبل الشركة الاردنية Vapco تحت

الاسم Tachigazol والذي يحتوي على 41.5 % من المادة الفعالة Hymexazole . وجرى الزرع بطريقة الوخز النقطي (Point inoculation)، سجلت النتائج بعد اربعة ايام من التحضين .

تلا ذلك عملية عزل الطافرات المقاومة . وقد جرى عزل نوعين من الطافرات المقاومة هما التلقائية والمستحثة . وكان الحث قد جرى باستخدام الاشعة فوق البنفسجية (253.7nm) المنبعثة من مصباح UV نوع NOP 189 Scottish Science والمجهز من قبل شركة Philip Haris الانكليزية . اذ يحضر عالق كونيدي كثافته بحدود 10^7 كونيدة /مل ويقسم الى قسمين 5 مل يستخدم لعزل الطفرات التلقائية و 10 مل يعرض للتشعيع كما موصوف في الجاف (1996). يجري الزرع بعدها بتلقيح 10 اطباق حاوية على التركيز السام من المبيد من كل من العالقين المشعع وغير المشعع وبواقع 0.1 مل /طبق ويحضن لمدة 4-5 ايام ويتحرى بعدها عن المستعمرات النامية التي عدت طافرات مقاومة .

طرق التحليل الوراثي :

استخدمت طرق التحليل الوراثي من تكوين متباين النوى لاجراء اختبارات السيادة والتتام وكذلك عزل النوى مضاعفة المجموعة الكروموسومية وتنصيفها لاسناد الجينات الجديدة الى مجاميعها الارتباطية (الكروموسومية) وهي تلك التي استخدمها (Dhahi, 1978 ; DeBertoldi and Caten, 1979) .

النتائج و المناقشة

عزل الطافرات

من ملاحظة النمو على التراكيز المتصاعدة من المبيد ظهر أن بامكان كلتا السلالتين ان تقاوم تراكيز مختلفة من المبيد ، حيث استطاعت السلالتان أن تقاومان تراكيز عالية من المبيد Hymexazol وصلت إلى 6225 مايكروغرام / مل ولكنها توقفت تماماً عند التركيز 8300 مايكروغرام / مل (الجدول 2) ولذا فقد جرى عزل الطافرات على هذا التركيز .

لقد جرى عزل 39 طفرة مقاومة من السلالة A76 ، 12 منها تلقائية و 25 منها مستحثة باشعة UV واعطيت كل منها الرمز HYM متبوعا برقم العزل او رقم الطافرة . ويشير الرمز HYM الى كون الطافرات مقاومة للمبيد Hymexazol . اضافة الى ذلك فقد جرى عزل 8 طافرات تلقائية و 37 طافرة مستحثة من السلالة AZG131 رمز لها كما في طافرات السلالة A76 وبذا صار مجموع الطافرات المقاومة المعزولة من السلالتين 84 طافرة رمز لها HYM1 , ... , HYM84 بينما استعملت الحروف الصغيرة *hym1* , ... , *hym84* للاشارة الى الطفرات (Mutations) وذلك تماشيا مع تعليمات تسمية الطفرات (Mutations) والطافرات (Mutants) المقترحة للفطريات (1973, 1974 Clutterbuck) .

الجدول 2: نمو السلالتين الأبويتين A76 و AZG 131 على تراكيز مختلفة من المبيد الفطري Hymexazol

تركيز المبيد (µg/ml)	نمو السلالة A76 على		نمو السلالة AZG 131 على	
	M+nic	M+nic + المبيد	M+lys	M+lys +المبيد
2075	+	+	+	+
4150	+	+	+	+
6225	+	±	+	±
8300	+	–	+	–

+ نمو تام ، ± نمو جزئي ، – عدم نمو

اختبارات السيادة والتتام :

اجري اختبار السيادة للطافرات ببناء متباينات النوى بين كل من الطافرات البنية (المعزولة من السلالة الابوية A76) والسلالة الابوية AZG131 وبين كل من الطافرات البيضاء (المعزولة من السلالة AZG131) والسلالة الابوية A76 وكما جاء في (Dhahi , 1978; DeBertoldi and Caten, 1979) . ومن خلال الزرع على الوسطين MD و MD+Hym، اذ نمت جميع متباينات النوى على الوسط الاول بينما اعطت نموا جزئيا ضعيفا على الوسط الثاني ، فقد استنتج ان جميع الطافرات هي طافرات شبه متنحية او قريبة من المتنحية ، وقد ورد مثل هذا الاستنتاج بشان سيادة الطافرات المقاومة للمبيدات الفطرية سيادة جزئية (شعبان والملاح، 1993 ; VanTuyl , 1977). وتنحي الطفرات بصورة عامة يتماشى مع حقيقة ان أي نظام بايولوجي هو نظام مستقر ومترسخ عبر تاريخ طويل من الانتخاب والتكيف وان أي طفرة تمثل خللا لا يكون في صالح استقرار النظام في اغلب الاحيان ولذا وجب ان يكون منتحيا امام الاليل البري (Strickberger , 1976; Hartl and Clarck, 1997 ; Lewin, 2004). بعد ان تبين ان جميع الطافرات هي طافرات شبه متنحية جرى استخدام احدى الطافرات البيضاء لبناء متباينات النوى مع جميع الطافرات البنية المعزولة من A76 . ثم زرعت هذه المتباينات على الوسطين MD و MD+Hym اذ نمت جميع المتباينات على كلا الوسطين بنفس الدرجة مما يشير الى ان الطفرات المحمولة في الافراد البنيةهي اليلية للطفرة في الفرد الابيض وهذا يعني ان هذه الطفرة و جميع الطفرات 39 المعزولة من السلالة A76 هي اليلات لنفس الجين وقد اعطي هذا الجين الرمز الجيني *hym A* اذ انه الجين الاول من نوعه الذي يجري عزله في هذا الفطر . (Clutterbuck, 1973, 1974 ; Dhahi, 1996)

وبالطريقة نفسها جرى تحضير متباينات نوى بين احدى الطافرات البنية وجميع الطافرات البيضاء وجرى اختبار هذه المتباينات بالطريقة نفسها وتبين ان الطفرات 45 البيضاء هي اليلية للطفرة البنية المستعملة للاختبار وعليه فان جميع الطفرات 84 ومن كلتا السلالتين هي اليلات لنفس الجين *hym A* .

اسناد الجين *hym A* الى كروموسومه :

ان احد الاهداف الرئيسية للبحث الحالي هو توسعة الخريطة الوراثية للفطر *Aspergillus amstelodami* من خلال اسناد المزيد من الجينات الى مجاميعها الارتباطية لزيادة عدد الجينات المشخصة على الكروموسوم الواحد او لتحديد كروموسومات جديدة . ويمكن ان يجرى ذلك باستخدام الطرق شبه الجنسية المستخدمة في الفطر *A.nidulans* (Clutterbuck , 1974) . وباستخدام هذه الطرق أمكن تحديد تسع (I-IX) مجاميع ارتباطية (الكروموسومات) في الفطر *A . amstelodami* (DeBertoldi and Caten, 1979 ; Dhahi and Caten, 1987 ; Dhahi, 1996)، و جرى بناء سلالات مرجعية معلمة لكل من هذه المجاميع التسع (Dhahi, 1996) . ولمعرفة موقع الجين *hymA* فقد جرى بناء سلالات مضاعفة المجموعة الكروموسومية (الخضراء اللون) من الطافرة HYM2 (*hymA2 wA lysA azgA131*) والسلالة المرجعية A167 التي تحمل علائم على المجاميع السبع الاولى في القطر الجدول (1) و من ثم جرى تنصيفها بواسطة البنليت . ونتيجة لما تقدم فقد تم الحصول على 101 سلالة منصفه المجموعة الكروموسومية ، وعند زرعها على الأوساط التفريقية المناسبة وملاحظة العلائم اللونية، تبين لنا بأن الجين *hymA* يتوزع توزيعاً حراً مع جميع العلائم في هذه السلالة ، ولم يبد تلازماً مع أي من علائمها ممّا يشير إلى عدم ارتباطه مع أي من الكروموسومات المعلمة لهذه السلالة الجدول (3)، يوضح الجدول (3) أن النسبة المئوية للتراكيب الجديدة تراوحت بين 52.47% مع الجين *oclA* في المجوعة V و 64.35 % مع الجين *argA* في المجموعة I، وأن عدد المنعزلات قد اختزل من 101 إلى 71 منعزلة في حالتي الجينين *dilA* ، *bwA* وذلك لان هذين الجينين لايمكن تعقبهما الا في المنعزلات الملونة فقط دون البيضاء *wA* وكذلك الجين *dilA* الذي يعني الصبغة المخففة(dilute) والتي قد تكون بنية (brown) أو خضراء (green) ولايمكن تعقبه في المنعزلات البيضاء *wA* ، اذ انها لاتحوي صبغة .

كما يشير الجدول (3) الى عدم تسجيل انعزال *hymA* مع الجين *azgA* المحمول على المجموعة السابعة (VII) في السلالة A167 وذلك لان الطافرة HYM2 هي الاخرى تحمل الجين *azgA* ، ولذا تبدو جميع المنعزلات مقاومة للعقار8-azaguanine ولا يمكن تعقب انعزال *hymA* مع هذا الجين في السلالة المرجعية A167. ولتحديد العلاقة الارتباطية بين *hymA* والمجموعة السابعة(VII) فقد جرى بناء سلالة مضاعفة المجموعة الكروموسومية بين HYM2 التي تحمل (*azgA131, hymA2*) مع

السلالة A76 التي تحمل الاليل البري *azgA+* على المجموعة السابعة وجرى تنصيفها والحصول على 91 عزله منصفة المجموعة الكروموسومية .

و من تعقب انعزال *hymA* مع *azgA+* تبين لنا الحصول على الأنواع الأربعة للمنعزلات المتوقعة من تنصيف هذه السلالة المضاعفة، و قد كانت النسبة المئوية للمنعزلات الجديدة 51.64 % الجدول (4) ممّا يشير إلى عدم ارتباط *hymA2* مع المجموعة السابعة . أما انعزال *hymA2* مع سائر العلائم في السلالة A76 فقد كان انعزالاً حراً وجاء تأكيداً لاستقلال *hymA2* عن أيّ منها، كما ظهر في الجدول (3). لذا يمكن الاستنتاج أن *hymA* غير مرتبط بأيّ من المجاميع السبع (I-VII) من السلالة المرجعية A167 .

اما بالنسبة لعلاقة ارتباط الجين *hymA* في المجموعتين الثامنة (VIII) او التاسعة (IX) المشخصتين في هذا الفطر (Dhahi, 1996) فلم يكن بالامكان تحديدها نظرا لعدم توفر السلالتين المرجعيتين الخاصتين بهاتين المجموعتين في حينها . لذا يكون الاستنتاج النهائي بشأن موقع *hymA* هو أن يكون واقعاً على احدى هاتين المجموعتين (الثامنة أو التاسعة) أو انه يمثل مجموعة ارتباط جديدة التي ستكون مجموعة الارتباط العاشرة في الفطر *Aspergillus amstelodami* .

الجدول :3 إنعزال الجين *hymA2* مع العلائم الوراثية في السلالة المرجعية A167 في 101 من القطاعات المنصفة المجموعة الكروموسومية المتحصلة من السلالة الثنائية المجموعة الكروموسومية الخليطة A167 / HYMA2

Diploid $\frac{HYM2}{A167}$: $\frac{+}{bwA}$ $\frac{+}{argA}$ $\frac{wA}{+}$ $\frac{lysA}{+}$ $\frac{+}{proA}$ $\frac{+}{sC}$ $\frac{+}{oclA}$ $\frac{+}{dilA}$ $\frac{azgA}{azgA}$ $\frac{hymA2}{+}$

عدد المنعزلات المنصفة المجموعة الكروموسومية ذات التركيب الجيني

مجاميع الإرتباط في السلالة A167		I		I		II		III		III		IV		V		VI	
وعلائم مجاميع الإرتباط		*bwA*		*argA*		*wA*		*lysA*		*proA*		*sC*		*oclA*		** *dilA*	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
الطفرة hymA2	+	24*	18	38*	16	30	29*	19	11*	11*	19	37*	20	30*	27	17*	20
	−	10	19*	20	27*	22*	20	43*	28	28	43*	23	21*	21	23*	16	18*
المجموع		71		101		101		101		101		101		101		71	
% التراكيب الجديدة		60.5		64.35		50.4		53.46		53.46		57.42		52.47		49.2	

* التراكيب الجديدة Recombination

** *dilA* يسجل الإنعزال مع هذا الجين في المنعزلات الملونة للكونيدات فقط (البنية والخضراء) .

+ الأليل البري wild type ، − الأليل الطافر ، الرموز الجينية في الثنائيات A167 X HYMA2 موضحة في الجدول (1) .

الجدول 4: إنعزال الجين *hymA2* مع العلائم الوراثية في السلالة المرجعية A76 في 91 من القطاعات المنصفة المجموعة الكروموسومية المتحصلة من السلالة ثنائية المجموعة الكروموسومية الخليطة A76 / HYMA2

Diploid: HYM2 / A76 : *hymA2* *azgA* + *lysA* *wA* + / + + *nicA* + + *bwA*

عدد المنعزلات المنصفة المجموعة الكروموسومية ذات التركيب الجيني

مجاميع الإرتباط في السلالةA76		I		II		III		IV		VII	
علائم مجاميع الإرتباط		*bwA*		*wA*		*lysA*		*NicA*		*azgA*	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
الطفرة hymA2	+	14*	16	30	*21	30	21*	30*	21	25	26*
	−	16	15*	31*	9	20*	20	22	18*	21*	19
المجموع		61		91		91		91		91	
% التراكيب الجديدة		47.54		57.14		45.05		58.74		51.64	

* التراكيب الجديدة Recombination

+ الأليل البري wild type لإنعزالات الجين

− الأليل الطافر

الرموز الجينية في الثنائيات A76 X HYMA2 موضحة في الجدول (1) .

المصادر العربية

الجاف، بهروز محمود، 1990. دراسة وراثية لمقاومة بعض مضادات المايتوز في الفطر *Aspergillus amstelodami*، رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

الحمداني، غادة عبد الله، 1985. دراسة مقاومة للعقاقير السامة في الفطر *Aspergillus amstelodami* اطروحة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق.

شعبان، عواد و الملاح، نزار مصطفى، 1993. المبيدات. دار الكتب للطباعة العراق.

العادل، خالد محمد و عبد، مولود كامل، 1979. المبيدات الكيمياوية في وقاية النبـــات. كليـــة الزراعـــة والغابات، جامعة الموصل، العراق.

العروسي، حسين و ميخائيل، سمير و عبد الرحيم، محمد علي، 2003 . مكافحة الأمراض النباتية. مكتبة المعارف الحديثة، الاسكندرية، مصر.

الناظر، ابراهيم و أبو رميلة، بركات، 2003. مبيدات الآفات. الجامعة الأردنية، عمان، المملكة الأردنية الهاشمية.

المصادر الاجنبية

Alexopoulos, G. J. and Mims, C. W. 1979. *Introductory Mycology*. Wiley, New York.

Caten, C.E., 1979. Genetical determination of conidial colour in Aspergillus heterocaryoticus and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami*. J. *Trans. Br. Mycol. Soc., 73*: pp.65-74.

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

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

Dhahi, S.J., 1978. *Genetic Studies in Aspergillus amstelodami.* Ph.D. Thesis, University of Birmingham, England.

Dhahi, S.J., 1996 . Constructing master strains for assigning genes to linkage groups in *Aspergillus amstelodami*. *Iraqi J. Sci, 37*: 441-454.

Dhahi, S.J. and Caten, C.E., 1987. Mutant of *Aspergillus amstelodami* resistant to 8-azaguanine, *Egypt. J. Genet. Cytol., 16*:209-220.

Hartl, D.L. and Clarck, A.G., 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Massachusetts.

Kane, R. and Miller, L., 2003. Controlling Dollar spot that is Resistant to fungicides interactive turf. Compartnered with the Dept. of Natural Resources at UIUC and the Chicago District Golf Association.

Legard, D., 2002 . How to prevent the development of fungicide resistance in strawberry pathogens. *Berry Times*. A Monthly Newsletter of the University of Florida Institute of Food and Agricultural Sciences. 11(7) .

Lewin, B., 2004. *Genes VIII* .Wiley, New York .

Michael, A, Yoshimora and Michailides, T.J., 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructiola* from stone fruit orchards in California . *App. Environ. Microbiol. 67*: 7145-7152.

Pillai, S.P., Pillai, C.A., Shankel, D.M. and Mischer, L.A., 2001. The ability of certain antimutagenic agents to prevent development of antibiotic resistance. *Mut. Res., 496*: 61-73.

Strickbeger, M., 1976. *Genetics*. Macmillan, New York.

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