التحري عن قدرة بعض المبيدات الفطرية على إحداث طفرات مقاومة في الفطر *Aspergillus amstelodami*

فادية موفق الحيالي و هدى وليد هادي

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق

استلام 29 نوفمبر 2017م - قبول 02 أغسطس 2018م

الملخص

أدت إساءة الاستخدام للمبيدات الفطرية إلى تنامي صفة المقاومة لدى العديد من الفطريات تجاه بعض تلك المبيدات، مما شكل تهديدًا خطيرًا على الإنتاج الزراعي جراء ظهور سلالات وراثية مقاومة أفقدت المبيدات الفطرية فعاليتها. شملت الدراسة التحري عن قدرة التركيز المثبط الأدنى لكل من المبيدين الفطريين الجهازيين (10% Hexaconazol) و(Prochloraz 25%) على إحداث طفرات جينية مقاومة في الفطر (*Aspergillus amstelodami*)، 17 طفرة مقاومة تلقائية، بمتوسط تكرار ($3.95x10^{-5}$) عند تركيز مثبط أدنى (300) مايكروغرام/ مل من المبيد (Hexaconazol) و(20) طفرة مقاومة تلقائية، بمتوسط تكرار ($4.26x10^{-5}$) عند تركيز مثبط أدنى (1.25) مايكروغرام/ مل من المبيد (Prochloraz). سجلت الدراسة عزل (94) طفرة مستحثة بحامض النتروز مقاومة للمبيد (Hexaconazol) بمتوسط تكرار ($39.388x10^{-5}$) و(100) طفرة مستحثة بحامض النتروز بمتوسط تكرار ($41.171x10^{-5}$) مقاومة للمبيد (Prochloraz). أظهرت الدراسة أن (2) من الطفرات التلقائية و(7) من الطافرات المستحثة بحامض النتروز مقاومة للمبيد (Hexaconazol) ومقاومة عرضية تجاه المبيد (Prochloraz)، في حين أظهرت (8) طفرات تلقائية و(15) طافرة مستحثة بحامض النتروز مقاومة تجاه المبيد (Prochloraz) ومقاومة عرضية تجاه المبيد (Hexaconazol). نستنتج مما سبق أن الفطر (*A. amstelodami*) قادر على مقاومة المبيدين قيد الدراسة، بالإضافة إلى وجود مقاومة عرضية بين السلالات المقاومة للمبيدين ساهمت بالحد من أهميتهما في مكافحة الفطريات؛ لذا يجب أن تؤخذ هذه النتيجة بالحسبان عند استخدام هذين المبيدين في مكافحة الإصابات الفطرية للنبات.

الكلمات المفتاحية: حامض النتروز، سلالة، المبيد (Hexaconazol)، المبيد (Prochloraz)، مقاومة عرضية.

المقدمة

شهدت السنوات الأخيرة من القرن المنصرم تزايدًا ملحوظًا في الإنتاج العالمي للمبيدات الكيميائية، وأصبحت المبيدات بصورة عامة والفطرية منها بشكل خاص إحدى المدخلات التكنولوجية لزيادة الإنتاج الزراعي (البريدي وآخرون، 2011).

أدت إساءة استخدام المبيدات الفطرية إلى تنامي صفة المقاومة للعديد من الفطريات تجاه بعض المبيدات الفطرية، مما شكل تهديدًا خطيرًا على الإنتاج الزراعي لظهور سلالات فطر مقاومة وراثياً لديها جينات جديدة تمنح الفطر بعض الآليات التي ساهمت بالتغلب على التأثير السام للمبيد، مما أفقد العديد من المبيدات الفطرية لفعاليتها وفقا لما ذكره Hof, 2001; Fisher *et al*. (2012); Klaassen *et al*. (2012). أبدت بعض السلالات المقاومة (resistant strains) للمبيدات الفطرية مقاومة تجاه مبيد فطري واحد أو أكثر ينتميان إلى نفس المجموعة الكيميائية، وهذا ما يعرف بالمقاومة العرضية (Cross-resistance) Cunha and Rizzo, 2003) (Chowdhary *et al*., 2012a).

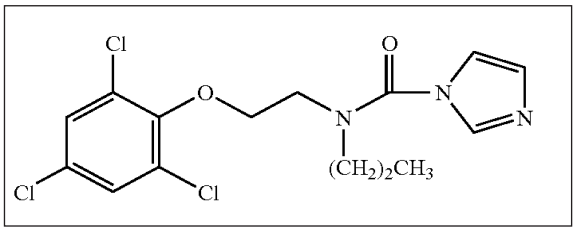
يعد المبيد الفطري (®Gona) (الشكل 1 أ) الحاوي على المادة الفعالة (10% Hexaconazol) مبيدًا فطريًا جهازيًا وقائيًا وعلاجيًا واسع الطيف ينتمي إلى مجموعة مبيدات Triazole وفقا لنظام FRAC Code (2010) (البريدي وآخرون، 2011، Ramesh and Kumaran, 2013).

أظهر هذا المبيد كفاءة كبيرة في السيطرة على العديد من الأمراض الفطرية التي تصيب المحاصيل الزراعية، مثل الخضروات والفواكه ونباتات الزينة؛ كالبياض الدقيقي، الصدأ، العفن البني، العفن الأسود ولفحة الغمد في نبات الرز وغيره (Idris *et al*., 2004; Thind, 2007; David *et al*., 2008; Chowdhary *et al*., 2012a)، كما تمتلك التراكيز الواطئة منه القدرة على التثبيط الكامل للفطر (*Alternaria alternata*)، وكذلك الفطريات (*Fusarium spp., Tricoderma spp.*) (Bajwa *et al*., 2010; Dinakaran *et al*., 2012 Panwar *et al*., 2013; Johnson *et al*., 2013).

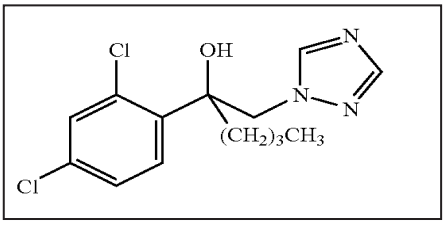
يعد المبيد (®Vector) (الشكل 1 ب) الحاوي على المادة الفعالة (25% Prochloraz) مبيدًا فطريًا جهازيًا وقائيًا وعلاجيًا واسع الطيف ينتمي إلى

المجموعة الكيميائية Imidazole وفقًا لما ذكره Vinggaard *et al*. (2006) و Skolness *et al*. (2011) والبريدي وآخرون (2011).

يظهر المبيد (Vector) فعالية كبيرة تجاه مسببات أمراض الفطرية للنبات التي تعود للجنس (*Fusarium*) و(*Colletotrichium*) و(*Alternaria alternata*)، Menniti *et al*., 2003; Serfling *et al*., 2007; Amini and Sidovich, 2010; Mateo *et al*., 2011 كما يستخدم في الحد من الأمراض الفطرية الناجمة عن مجموعة (Ascomycetes) التي تصيب محاصيل القمح والشعير بعد حصادها (البريدي وآخرون، 2011)، بالإضافة إلى ذلك فقد أظهرت العزلات الطبية للفطر (*Aspergillus fumigatus*) حساسية عالية جدًّا تجاه هذا المبيد (Meneau and sanglard, 2005).



(أ) Hexaconazole



(ب) Prochloraz

الشكل(1): التراكيب الكيميائية للمبيدين المستعملين قيد الدراسة

آلية عمل المبيدين تعتمد على تثبيط البناء الحيوي للـ(ergesterol) الذي يعد المكون الأساسي للغشاء الخلوي في الخلايا الفطرية؛ مما يؤدي إلى منع نمو المايسليوم، وذلك من خلال تأثيره على إنزيم (lanosterol 14α-demethylase) المثبط لعمل السايتوكروم (Cytochrome P450) (P450)؛ لذا عدت هذه المبيدات من المبيدات المثبطة لعملية إزالة المثيل De Methylation Inhibition (DMI) (Ramesh and Kumarh, 2013; FRAC Code, 2010; Skolness *et al*., 2011).

يهدف البحث الحالي إلى التحري عن مدى إمكانية حصول طفرات مقاومة في فطر (*Aspergillus amstelodami*) تجاه المبيدين الفطريين، مع اختبار وجود مقاومة عرضية بينهما، كونهما يعودان لنفس المجموعة الكيميائية.

المواد وطرق العمل

الكائن الاختباري وتاريخ إجراء التجارب ومكان إجرائها:

أجريت الدراسة باستعمال السلالة القياسية (A_1(*WA*$_1$)) من الفطر (*A.amstelodami*) المبين أصلها في Caten (1979)، والتي زودنا بها مشكورًا Dr.C.E.Caten من قسم الوراثة من جامعة برمنكهام/ إنكلترا، وقد تم إجراء التجارب في مختبر البحوث في قسم علوم الحياة/ كلية العلوم/ جامعة الموصل، في الأشهر تشرين الثاني وكانون الأول للعام 2013 وكانون الثاني وشباط للعام 2014.

الأوساط الزراعية المستخدمة

اعتمد الوسطان الزراعيان؛ الوسط الأدنى غير المعضد (Minimal medium (M)) المضاف إليه مواد الاختبار، ووسط مستخلص الشعير– ملح الطعام ((Malt extract salt medium (MTS)) للحصول على أكبر عدد من الكونيدات، وللحصول على مستعمرات منفردة أضيف إلى الوسط الغذائي (M) مادة (Sodium deoxycholate) (D) بتركيز نهائي قدره (400) مايكروغرام/ مل لنحصل على الوسط (MD) (الطائي، 2006).

المحلول الخزين للمبيدات الفطرية

تم الحصول على المبيدين الفطريين (Gona®) الحاوي على المادة الفعالة (Hexaconazol بتركيز (10 %) الشركة المنتجة: Shenzhen sunrising industry co., ltd) والمبيد (Vector®) الحاوي على المادة الفعالة (Prochloraz بتركيز (25 %) الشركة المنتجة: Anhui sinotech industrial co., ltd) من الأسواق المحلية. حضر محلول خزين للمبيدين بتركيز (1000 و 25) مايكروغرام من المادة الفعالة/ مل على التوالي.

تحديد التركيز المثبط الأدنى
Minimum Inhibitory Concentration (MIC):

جرى تحديد التركيز الأدنى المثبط للنمو (MIC)

لكل مبيد على حدة باستخدام الوسط (M) الحاوي على تراكيز تصاعدية (0 - 0.1 - 0.2 - 0.3 - 0.4 - 0.5 - 0.6 - 0.7 - 0.8 - 0.9 - 1) مايكروغرام/ مل من المبيد (Prochloraz)، في حين استخدمت التراكيز (0 - 1 - 20 - 50 - 75 - 100 - 125 - 150 - 175 - 200 - 225 - 250 - 275) من المبيد (Hexaconazol). حُسبت هذه التراكيز على أساس المادة الفعالة لكل مبيد، واتبعت طريقة الوخز (Point Inoculation) بتلقيح عدة وخزات من السلالة (A1) على طبق حاوي على الوسط (M) المضاف إليه تركيز معين من المبيد قيد الدراسة، بواقع أربعة أطباق (R1، R2، R3، R4) لكل تركيز. حسبت النسبة المئوية للتثبيط بعد أربعة أيام من التحضين، وذلك بحساب معدل أقطار المستعمرات النامية حول نقطة الوخز في كل طبق، وقورنت بقطر المستعمرات النامية على الوسط الأدنى (M) الخالي من المبيد، التي تمثل قراءة المقارنة (Control) (Panwar *et al*., 2013)، كما تم حساب النسبة المئوية للتثبيط:

النسبة المئوية للتثبيط=

$$\frac{\text{متوسط المعاملة التلقائية (المقارنة)} - \text{متوسط المعاملة بالمبيد}}{\text{متوسط المعاملة التلقائية (المقارنة)}} \times 100$$

تحضير العالق الكونيدي

حضر العالق الكونيدي للفطر (*A.amstelodami*) بتركيز 10^7 كونيدة/ مل من مزرعة حديثة عمرها أربعة أيام منماة على الوسط (MTS) وباستخدام (Haemocytometer) (الطائي، 2006).

عزل الطافرات المقاومة

جرى عزل نوعين من الطافرات المقاومة؛ هما التلقائية وذلك بتلقيح (10) أطباق حاوية على الوسط (MD) مضافًا إليه المبيد بتركيز أعلى من التركيز السام لكل مبيد على حدة (300 مايكروغرام/ مل Hexaconazol و1.25 مايكروغرام/ مل Prochloraz)، بواقع (0.1) مل/ طبق من العالق الكونيدي المحضر سابقًا، كما تم تلقيح (3) أطباق حاوية على الوسط (MD) بـ(0.1) مل/ طبق من التخفيف (10^{-4}) من العالق الكونيدي لحساب العدد الحي. أما الطافرات المستحثة فقد عزلت من خلال تعرض العالق الكونيدي إلى حامض النتروز للحصول على عالق كونيدي مطفر بحامض النتروز (مطفر معلوم) (Justin, 2010). لقحت (10) أطباق حاوية على الوسط (MD) مضافًا إليه التركيز السام من كل مبيد على حدة بواقع (0.1) مل/ طبق من العالق الكونيدي المطفر، كما لقحت (3) أطباق حاوية على الوسط (MD) بـ (0.1) مل/ طبق من التخفيف (10^{-4}) من العالق الكونيدي لتحديد العدد الحي. حضنت الأطباق عند درجة حرارة (28م°) لـ(5-4) أيام لحساب العدد الحي، و(8-6) أيام للتحري عن المستعمرات الطافرة المقاومة (الراوي، 2011). قدر تكرار الطافرات المستحثة والتلقائية من خلال:

$$\text{تكرار الطافرات} = \frac{\text{عدد الأفراد الطافرة عند أي معاملة}}{\text{حجم العشيرة المتوقعة لتلك المعاملة}} \times 100$$

قدر حجم العشيرة الكونيدية المتوقعة من العالق غير المخفف لكلا المعاملتين من خلال:

حجم العشيرة المتوقعة = معدل عدد المستعمرات على أطباق MD × مقلوب التخفيف × عدد الأطباق الملقحة من العالق 10^0

اختبار المقاومة العرضية

جرى التحري عن قدرة الطافرات المقاومة (التلقائية والمستحثة) المعزولة لكل من المبيدين على مقاومة تراكيز أعلى بقليل من التركيز الأدنى المثبط للمبيد الآخر والقاتلة للسلالة الأبوية بطريقة (replicator)، وذلك بتلقيح الطافرات على أطباق حاوية على الوسط (M) مضافًا إليه تراكيز من المبيدات التي تسمح بنمو الطافرات المقاومة دون غيرها والتي كانت (300 مايكروغرام/ مل Hexaconazol و 1.25 مايكروغرام/ مل Prochloraz. حضنت الأطباق بدرجة حرارة (28)م° ولمدة (6) أيام. سجلت النتائج من خلال ملاحظة نمو العزلات وفقًا لما ذكره Meneau and Sanglard (2005) و(2012) Snelders *et al*.

التحليل الإحصائي

تم إجراء التحليل الإحصائي للنتائج باستعمال اختبار (T) عند مستوى ($P<0.05$) (Cochran and Cox, 1957) وذلك لتوضيح الفروق بين المعاملات وعينة المقارنة.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تحديد التركيز الأدنى (MIC) للمبيدين قيد الدراسة تثبيط الفطر (*Aspergillus amstelodami*) بنسبة (100 %) عند التركيز (275)

مايكروغرام من المبيد Hexaconazole/ مل من الوسط الزرعي، الجدول (1).

وهذا التركيز يعد مرتفعًا مقارنة مع فعالية هذا المبيد تجاه فطريات أخرى (Bajwa *et al*., 2010; Dinakaran *et al*., 2012; Johnson *et al.*, 2013; Panwar *et al*., 2013)، في حين سجلت نفس النسبة عند استخدام تركيز 1 مايكروغرام من المبيد Prochloraz/ مل من الوسط الزرعي، الجدول (2). وهذه النتيجة تتفق مع الدراسة التي أجريت على عزلات طبية من الفطر (*Aspergillus fumigatus*) (Snelders *et al*., 2009)، في حين سجلت دراسة حديثة استخدام تركيز (4) مايكروغرام من المبيد/ مل من الوسط لتثبيط الفطر *A. fumigatus* (Faria_Ramos *et al*., 2014).

الجدول (1): أقطار مستعمرات السلالة البرية للفطر (*A.amstelodami*) المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيز متصاعدة من المبيد (Hexaconazol)

التركيز ميكروغرام/ مل	تكرار أقطار المستعمرات (سم)				متوسط قطر المستعمرة (M)	النسبة المئوية للتثبيط %
	R1	R2	R3	R4		
0	1.5	3.0	1.7	2.0	2.050	—
1	1.5	1.5	1.4	1.3	1.425	30.48
20	1.0	1.1	1.2	1.0	1.075	47.56
50	0.5	1.0	1.0	0.8	0.825	59.75
75	0.5	0.5	0.7	0.5	0.550	73.17
100	0.3	0.4	0.3	0.3	0.325	84.14
125	0.2	0.3	0.4	0.3	0.300	85.36
65- 150	0.2	0.2	0.2	0.3	0.225	89.02
85-175	0.1	0.1	0.1	0.1	0.100	95.12
200	0.1	0.0	0.1	0.0	0.050	97.50
275	0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	100

R1، R2، R3، R4: مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر (*A.amstelodami*) عند كل تركيز.

الجدول (2): أقطار مستعمرات السلالة البرية للفطر (*A.amstelodami*) المزروعة على الوسط (M) المضاف إليه تراكيز متصاعدة من المبيد (Prochloraz)

التركيز ميكروغرام/ مل	قطر المستعمرة (R) سم				متوسط قطر المستعمرة (M)	النسبة المئوية للتثبيط %
	R1	R2	R3	R4		
0	1.5	2.7	1.5	2.3	2.000	—
0.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.000	50.00
0.3	0.9	0.9	1.0	1.0	0.950	52.50
0.4	0.5	0.7	1.0	0.8	0.750	62.50
0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.375	81.25
0.6	0.2	0.3	0.3	0.3	0.275	86.25
0.7	0.1	0.2	0.1	0.1	0.125	93.75
0.8	0.0	0.1	0.0	0.1	0.050	97.50
0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.100	98.75
1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.000	100

R1، R2، R3، R4: مكررات الأطباق المستخدمة لقياس أقطار مستعمرات الفطر (*A.amstelodami*) عند كل تركيز.

تظهر النتائج المبينة في الجدولين (1و2) وجود علاقة طردية بين الزيادة في تركيز المبيد والنسبة المئوية للتثبيط مع وجود تباين كبير في التراكيز المثبطة الدنيا لكلا المبيدين، بالرغم من انتمائهما لنفس المجموعة الكيميائية الثلاثية الأزول، التي تستهدف تثبيط البناء الحيوي للـ (ergesterol) الذي يعد المكون الأساسي للغشاء الخلوي في الخلايا الفطرية؛ مما يؤدي إلى منع نمو المايسليوم (Zarn *et al*., 2003; Idris *et al*., 2004; Bajwa *et al*., 2010; Panwar *et al*., 2013). وهذه النتيجة تتفق مع نتائج العديد من الدراسات التي أشارت إلى فعالية المبيد (Prochloraz) في الحد من الأمراض الفطرية الناجمة عن مجموعة الفطريات الكيسية (Ascomycetes) التي تصيب محاصيل القمح والشعير بعد حصادها (البريدي وآخرون، 2011; Snelders *et al*., 2009; Chowdhary *et al*., 2012a).

سجلت الدراسة الحالية تغيرات شكلية ولونية على الفطر (*A.amstelodami*) عند المعاملة بمبيد (Hexaconazole) عند التراكيز (150–175) مايكروغرام/ مل من الوسط الزرعي، شملت تغير لون الكونيدات من اللون الأصفر إلى البرتقالي، وهذه النتيجة تتفق مع ما أشار إليه (Varanasi *et al*., 2004) أن الأزول في بعض الأحيان يرتبط بجسيمات صبغية معينة تدعى (Phytochrom)، تكون بمنزلة المنظم لابتداء عملية النمو والتطور التسلسلي للكونيدات، وهذا الارتباط بدوره يعيق نمو الكونيدات واصطباغها (Varanasi *et al*., 2004)، في حين لم تسجل الدراسة مثل هذه التغيرات الشكلية عند معاملة الفطر بالمبيد (Prochloraz). سجلت الدراسة عزل (17) طفرة تلقائية و(94) طفرة مستحثة بحامض النتروز مقاومة للمبيد (Hexaconazol) وقد عزلت بمعاملة كونيدات الفطر بتركيز (300) مايكروغرام/ مل من المبيد (Hexaconazol)، الجدول (1). ومن حساب حجم العشيرة لكل معاملة تبين أن متوسط تكرار الطافرات التلقائية ($3.95x10^{-5}$)، في حين سجل متوسط تكرار الطافرات المستحثة ($39.39x10^{-5}$)، الجدول (3). ومن خلال التحليل الإحصائي تبين وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($0.05\geq$) بين متوسط تكرار الطافرات التلقائية والمستحثة بحامض النتروز المقاومة للمبيد (Hexaconazol)، الجدول (4).

الجدول (3): حجم العشيرة المتوقعة ($\times10^{5}$) وعدد الطافرات المقاومة للمبيد (Hexaconazole) وتكرارها ($\times10^{-5}$) المشاهدة بين كونيدات الفطر (*A.amstelodami*) التلقائي والمعاملة بحامض النتروز

المعاملة	R1			R2			R3		
	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
0	112.8	5	4.43	180	7	3.88	141	5	3.54
HNO_3	78	38	48.73	82.33	31	37.65	78.67	25	31.78

0: بدون معاملة وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات التلقائية.

HNO_3: المعاملة بحامض النتروز وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات المستحثة.

الجدول (4): متوسط تكرار الطافرات ($\times10^{-5}$) المقاومة للمبيد (Hexaconazole) بين كونيدات الفطر (*A. amstelodami*) التلقائية والمعاملة بحامض النتروز

المعاملة	المكررات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة $t_{(4)}$ * المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	4.43	3.88	3.54	0.132±3.95	_
HNO_3	48.73	37.65	31.78	4.97±39.39	7.1983

0: بدون معاملة وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات التلقائية.

HNO_3: المعاملة بحامض النتروز وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات المستحثة.

*: معنوية عند مستوى احتمالية (0.05).

بينت نتائج معاملة كونيدات الفطر بالتركيز (1.25) مايكروغرام/ مل من المبيد (Prochloraz)، عزل (20) طفرة مقاومة تلقائية و(100) طفرة مستحثة بحامض النتروز بمتوسط تكرار ($4.26x10^{-5}$) و($41.17x10^{-5}$) على التوالي، الجدول (5). وقد أظهر التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية (0.05≥) بين متوسط تكرار الطافرات التلقائية والمستحثة بحامض النتروز المقاومة للمبيد (Prochloraz)، الجدول (6).

الجدول (5) حجم العشيرة المتوقعة ($\times10^{5}$) وعدد الطافرات المقاومة للمبيد (Prochloraz) وتكرارها ($\times10^{-5}$) المشاهدة بين كونيدات الفطر (*A.amstelodami*) التلقائي والمعاملة بحامض النتروز

المعاملة	R1			R2			R3		
	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة	حجم العشيرة المتوقعة	عدد الطافرات المقاومة	تكرار الطافرات المقاومة
0	167	8	4.79	161.5	6	3.72	140.3	6	4.28
HNO_3	84.7	34	40.16	78	35	44.88	77.3	31	40.09

0: بدون معاملة وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات التلقائية.

HNO_3: المعاملة بحامض النتروز وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات المستحثة.

الجدول (6): تكرار الطافرات ($\times10^{-5}$) المقاومة للمبيد (Prochloraz) بين كونيدات الفطر (*A. amstelodami*) التلقائية والمعاملة بحامض النتروز

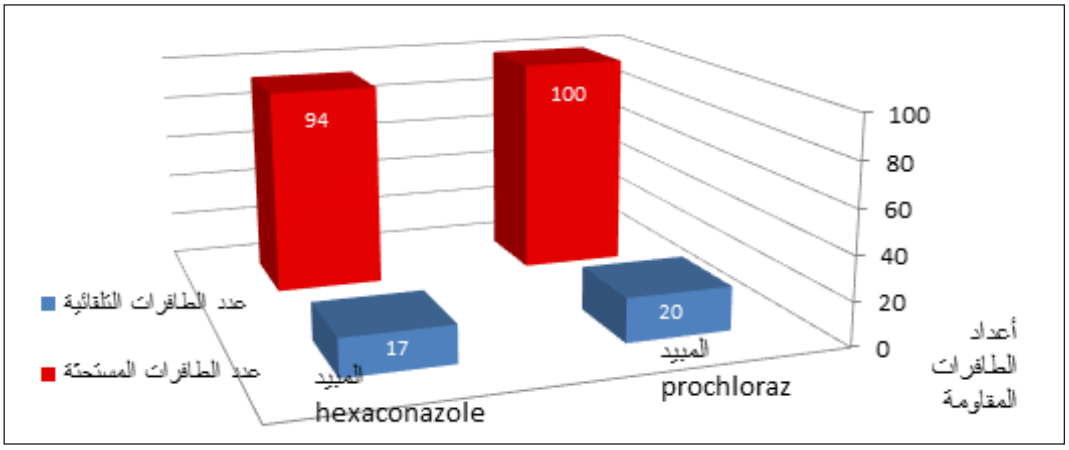
المعاملة	المكررات			المتوسط ± الخطأ القياسي	قيمة $t_{(4)}$ * المحسوبة
	R1	R2	R3		
0	4.79	3.72	4.28	0.30±4.263	–
HNO_3	40.16	44.88	40.09	1.586±41.17	23.273

0: بدون معاملة وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات التلقائية.

HNO_3: المعاملة بحامض النتروز وتمثل تكراراتها تكرارات الطافرات المستحثة.

*: معنوية عند مستوى احتمالية (0.05).

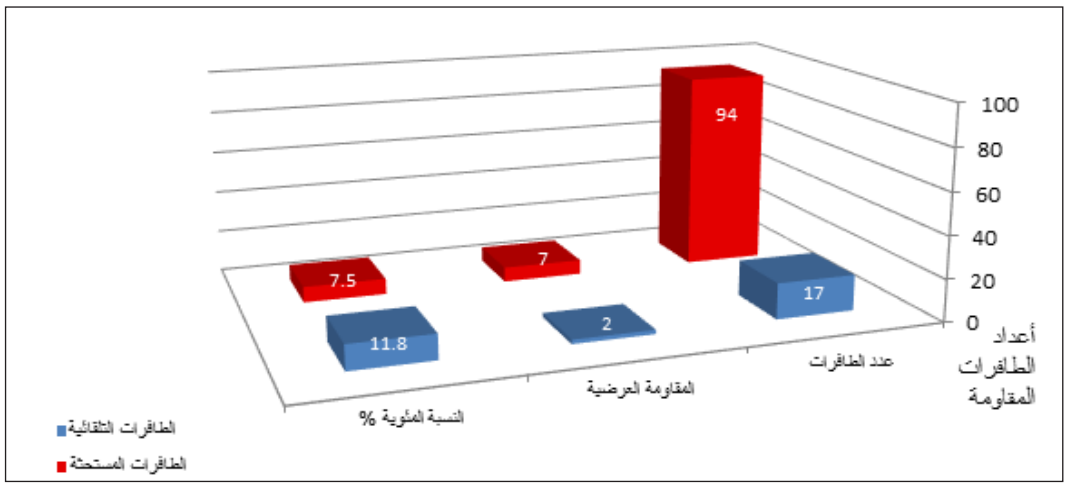
سجلت الدراسة وجود طافرات تلقائية ومستحثة مقاومة للمبيد (Prochloraz) عند التركيز (1.25) مايكروغرام/ مل أكثر مما سجلت تجاه المبيد (Hexaconazole) عند التركيز (300) مايكروغرام/ مل، الشكل (2). وعليه فإن متوسط تكرار الطافرات المقاومة (التلقائية والمستحثة) للمبيد (Prochloraz) كان أكبر مما سجل مع المبيد (Hexaconazole)، الجداول (3–5)، بالرغم من امتلاكهم نفس الموقع المستهدف، وهذا الاختلاف قد يعود إلى التركيز العالي للمبيد (Hexaconazole) مقارنة بالمبيد (Prochloraz)، أو امتلاك الفطر آليات أخرى للمقاومة؛ كحدوث تغيرات في تسلسل الأحماض الأمينية التي يشفرها الجين (Cytochrome P51A) المسؤول عن بناء إنزيم (14α-demethylase) الذي يعد أحد مكونات مسار البناء الحيوي للـ(ergesterol) الذي يستهدفه المبيد (Snelders *et al*., 2008; Howard *et al*., 2009; Mortensen *et al*., 2010; Skolness *et al*., 2011; Chowdhary *et al*., 2012b).



الشكل (2) عدد الطافرات المعزولة التلقائية والمستحثة بحامض النتروز للمبيدين (Hexaconazole) و(Prochloraz)

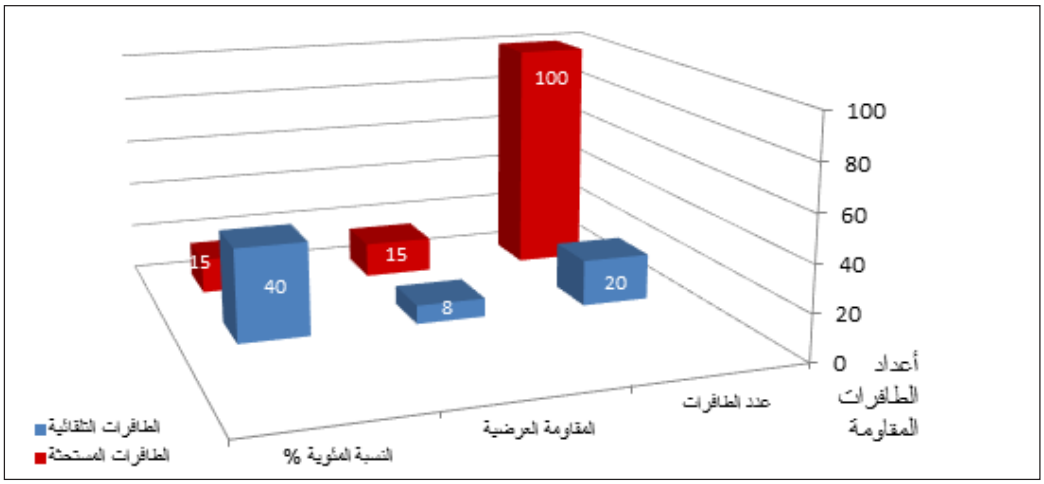
تشير النتائج الموضحة في الجداول (3، 4، 5، 6) إلى انخفاض أعداد تكرار الطافرات التلقائية مقارنةً بتكرارات الطافرات المستحثة والمقاومة لكلا المبيدين، وهذا يتفق مع Justin (2010)، الذي أشار إلى أن حامض النتروز هو عامل مطفر، إلا أن هذا لا ينفي ظهور طافرات تلقائية في الفطر (*A. amstelodami*) تبدأ بسبور واحد طافر، ومع التضاعف للحامض النووي وحدوث الانقسامات يصبح مستعمرة فطرية طافرة مقاومة تنشر سبوراتها في الهواء مسببة خطرًا على المدى البعيد، ولا سيما عند مقاومتها لمركب كيميائي مثل الأزول ذي أهمية كمضادات علاجية فطرية طبية أو كمبيدات فطرية زراعية كما ذكر كلّ من Snelders *et al.* (2008); Chowdhary *et al.* (2012b); Berger *et al.* (2017).

تظهر نتائج الكشف عن وجود مقاومة عرضية بين المبيدين (Hexaconazole) و(Prochloraz) قدرة بعض الطافرات المقاومة لأحد المبيدات على مقاومة المبيد الآخر؛ إذ يتضح لنا وجود عزلتين طافرتين تلقائيتين و(7) طافرات مستحثة مقاومة للمبيد (Hexaconazole) أعطت مقاومة عرضية تجاه المبيد (Prochloraz) بنسب (11.8 %) و(7.5 %) على التوالي، الشكل (3).



الشكل (3): النسبة المئوية لعدد الطافرات التلقائية والمستحثة المقاومة لـ(Hexaconazole) التي أبدت مقاومة عرضية تجاه (Prochloraz)

تظهر النتائج المبينة في الشكل (4) وجود (8) عزلات طافرة تلقائية و(15) عزلة طافرة مستحثة مقاومة للمبيد (Prochloraz)، أبدت مقاومة عرضية تجاه المبيد (Hexaconazole)، وبنسب (40 %) و(15 %) على التوالي.



الشكل (4): النسبة المئوية لعدد الطافرات التلقائية والمستحثة المقاومة لـ (Prochloraz) التي أعطت مقاومة عرضية لـ (Hexaconazole)

هذه النتائج تتفق مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى أن التركيب الجيني للفطر هو الذي يحدد آلية المقاومة وخطرها؛ إذ قد تتمكن عزلة واحدة مقاومة من إعطاء مقاومة متعددة (Multi Drug Resistance (MDR)) لأكثر من مضاد علاجي خاصة إذا كان من نفس المجموعة الكيميائية، وهذا النوع من المقاومة العرضية موجود بين المبيدات DMI (FRAC Code, 2010; Fisher *et al*., 2012).

في هذه الدراسة تم عزل طافرات تلقائية ومستحثة بحامض النتروز مقاومة للمبيد إلا أن جميعها لم تستطع إعطاء مقاومة مستعرضة تجاه المبيد الآخر، الشكلان (2و3)، على الرغم من امتلاك كلا المبيدين لنفس المجموعة الكيميائية، وهذا الفرق قد يعود إلى أن صفة المقاومة للمبيدات لها اليلات مختلفة لنفس الجين (Snelders *et al*., 2012; Dyer, 2000).

وعليه فإن العزلات الطافرة المقاومة لعدد من المبيدات من الممكن أن تلغي دور المضادات العلاجية الحاوية على مركب الأزول، ومنها المضاد (Itraconazole) المستخدم في علاج (Aspergillosis)، وبهذا تصبح المبيدات المستخدمة في الزراعة عاملاً مهمًّا جدًّا في زيادة معدل الطفور لسلالات الفطر (*A. fumigatus*) المسببة لمرض لل (Aspergillosis) في الإنسان، وهذا الطرح يتفق مع الفرضية القائلة (إن تعرض الفطر لمبيدات الأزول في الطبيعة أعطته مقاومة عرضية للمضادات الطبية التي لها نفس التركيب). Howard *et al*., 2009; Snelders *et al*., 2009;) Mortensen *et al*., 2010; Chowdhary *et al*., 2012b; Snelders *et al*., 2012).

إن ظهور صفة المقاومة العرضية في طافرات الفطر (*A. amstelodami*) تجاه المبيدين قيد الدراسة يسهم في الحد من الجدوى الاقتصادية لاستخدامهم في مكافحة الإصابات الفطرية للنبات. وقد أشارت بعض الدراسات إلى إمكانية الحد من هذه المقاومة بمزج مبيدين أو أكثر للحصول على فعالية أقوى ضد الفطر المرض (Halleenl *et al*., 2000; Dinakaran *et al*., 2012)، فضلاً عن استخدام السيطرة البايوكيميائية في مكافحة الفطريات المرضة (Rajesh *et al*., 2014).

المراجع

البريدي، فهد بن حمد، والفهيد، ماجد بن سعود، والحسون، إبراهيم بن عبد الله، والطبيشي، عبدالعزيز بن على. 2011م. دليل المبيدات الزراعية في المملكة العربية السعودية. الطبعة الأولى، وزارة الزراعة، إدارة الخدمات الزراعية.

الراوي، جيهان موفق. 2011م. دراسة التأثير المضاد للطفرة للمستخلص الكحولي لدرنات نبات السعد *Cyperus rotandus* وأوراق نبات الميرامية *Salvia officinalis* في الفطر *Aspergillus amstelodami*. مجلة علوم الرافدين، كلية العلوم، جامعة الموصل، العراق، المجلد (22)، العدد (3)، ص ص 35-45.

الطائي، رافع قاسم محمد. 2006م. تأثير مستخلصات الثوم على القابلية التطفيرية لكل من السورالين والأشعة فوق البنفسجية في الفطر *Aspergillus amstelodami*. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، العراق.

Dyer, P. S., Hansen, J., Delaney, A., and Lucas, J. A. 2000. Genetic control of resistance to the sterol 14α-demethylase inhibitor fungicide prochloraz in the cereal eyespot pathogen *Tapesia yallundae*. Appl. Environ. Microbiol. 66(11): 4599-4604.

Faria-Ramos, I., Farinha, S., Neves-Maia, J., Tavares, P. R., Miranda, I. M., Estevinho, L. M., Pina-Vaz, C., and Rodrigues, A. G. 2014. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. BMC Microbiol. 14(155):1-5.

Fisher, M.C., Henk, D.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., and Madoff, L.C., 2012 Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature 484: 186-194.

FRAC Code List 2010. Fungicides sorted by mode of action. Accessed on 28/9/2017 from http://cutt.us/Npfhi.

Halleen, F., Holz, G., and Pringle, K.L.2000. Resistance in *Uncinula necator* to triazole fungicides in South African grapevines. *S.* Afr. J. Enol. Vitic. 21(2):71–80.

Hof, H. 2001. Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. Antimicrob Agents Chemother. 45: 2987–2990.

Howard, S.J., Cerar, D., Anderson, M. J., Albarrag, A, Fisher, M. C., Pasqualotto, A. C., Laverdiere, M., Arendrup, M. C., Perlin, D. S., and Denning, D. W. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. Emerg. Infect. Dis. 15(7): 1068–1076.

Idris, A. S., Ismail, S., Ariffin, D., and Ahmad, H. 2004. Prolonging the Productive Life of Ganoderma-Infected Palms with Hexaconazole. (MPOB INFORMATION SERIES) MPOB TT No. 214. Accessed on 28/9/2017 from http://palmoilis.mpob.gov.my/publications/TOT/TT-214.pdf

Johnson, I., Marimuthu, T., Ramjegathesh, R., Raguchander, T., Karthikeyan, M., and Samiyappan, R. 2013. Hexaconazole 5^{SC} for the management of rice sheath blight. J. Tod. Bio. Sci: Res. Rev. 2(1): 29-35.

Amini, J., and Sidovich, D. F. 2010. The effects of fungicides on *Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Lycopersici* associated with fusarium wilt of tomato. J. Plant Prot. Res. 50(2):172-178.

Bajwa, R., Mukhtar, I., and Mushtaq, S. 2010. New report of *Alternaria alternata* causing leaf spot of *Aloe vera* in Pakistan. *Canad.* J. Plant. Pathol. 32(4):490-492.

Berger, S., Chazli, Y. E., Babu, A. F., and Coste, A. T. 2017. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture? Front. Microbiol. 8(1024): 1-6.

Caten, C. E. 1979.Genetic determination of conidial colour in *Aspergillus heterocaryoticus* and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami*. Trans. Brit. Myco. Soci. 73:47-65.

Chowdhary, A., Kathuria, S., Xu, J., Sharma, C., Sundar, G., Singh, P. K, Gaur, S. N., Hagen, F., Klaassen, C. H., and Meis, J. F. 2012a. Clonal expansion and emergence of environmental multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR_{34}/L98H mutations in the *cyp*51A Gene in India. PLoS One. 7(12).

Chowdhary, A., Kathuria, S., Randhawa, H. S., Gaur, S. N., Klaassen, C. H., and Meis, J. F. 2012b. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the *cyp*51A gene in India. J. Antimicrob. Chemother. 67: 362–366.

Cochran, W., and Cox, G. 1957. Experimental Designs, second edition. Wiely, New York.

Cunha, M. G., and Rizzo, D.M. 2003 Development of fungicide cross resistance in *Helminthosporium solani* populations from california. Plant Dis. 87(7): 798-803.

David, D., Prabhakar, A., Peter, J. V., and Pichamuthu, K. 2008. Human poisoning with hexastar™: A hexaconazole-containing agrochemical fungicide. Clinc. Tox. 46(7):692-693.

Dinakaran, D., Mathiyazhagan, S., Thiruvudainambi, S., Gajendran, G., Kathiresan, G. 2012. Efficacy of zineb + hexaconazole on the management of sheath blight, brown spot and grain discoloration in rice. ORYZA Int. J. R. 49(2): 144- 146.

Serfling, A., Wohlrab, J., and Deising, H. B. 2007. Treatment of a clinically relevant plant-pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. Antimicrob. Agents & Chemoth. 51: 3672-3676.

Skolness, S. Y. ,Durhan, E. J. ,Garcia-Reyero, N., Jensen, K. M., Kahl, M. D. ,Makynen, E. A. ,Martinovic-Weigelt, D., Perkins, E., Villeneuve, D. L., and Ankley, G. T. 2011. Effects of a short-term exposure to the fungicide prochloraz on endocrine function and gene expression in female fathead minnows (*Pimephales promelas*). Aqu. Toxi. 103: 170-178.

Snelders, E., Camps, S. M. T., Karawajczyk, A., Schaftenaar, G., Kema, G. H. J. Van der lee, H. A, Klaassen, C. H., Melchers, W. J. G., and Verweij, P. E. 2012. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. PLoS ONE. 7(3): e31801.

Snelders, E., van der Lee, H. A. L., Kuijpers, J., Rijs, A. J. M. M., Varga, J., Samson, R. A., Mellado, E., Donders, A. R. T., Melchers, W. J. G., and Verweij P. E. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. PLoS ONE. 7(12): e52871.

Snelders, E. , Huis in 't Veld, R. A. G., Rijs, A. J. M. M., Kema, G. H. J., Melchers, W. J. G., and Verweij, P. E. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. Appl. Environ. Microbiol. 75(12): 4053–4057.

Thind, T. S. 2007. Changing cover of fungicide umbrella in crop protection. Indian Phytopath. 60: 421–433.

Varanasi, N.L., Baskaran, I., Alangaden, G. J., Chandrasekar, P. H., and Manavathu, E.K. 2004. Novel effect of voriconazole on conidiation of *Aspergillus* species. Int. J. Anti. Agen. 23(1): 72–79.

Vinggaard, A. M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H. R., Bonefeld-Jørgensen, E., Christiansen, S., Laier, P, and Poulsen, M.E. 2006. Prochloraz: An imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. Int. J. Androl. 29(1):186-192.

Justin, K., Viateur, U., and Prudentienne, M. 2010. Use of nitrous acid mutant of *Aspergillus niger* for citric acid production from local cane-molasses. Afric. J. Microbiol. Resear. 4(13): 1446-1452.

Klaassen, C. H., Gibbons, J. G., Fedorova, N. D., Meis ,J. F., and Rokas, A. 2012. Evidence for genetic differentiation and variable recombination rates among Dutch populations of the opportunistic human pathogen *Aspergillus fumigatus*. Mol. Ecol. 21(1): 57–70.

Mateo, E. M., Valle-Algarra, F. M., Mateo, R., Jiménez, M., and Magan, N. 2011. Effect of fenpropimorph, prochloraz, and tebuconazole on growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* in oat –based medium. Int. J. Food Microbiol. 151(2011):289-298.

Meneau, I., and Sanglard, D. 2005.Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. Med. Mycol. 43:s307-s311.

Menniti, A. M., Pancaldi, D. Maccaferri, M., and Casalini, L. 2003. Effect of fungicides on *Fusarium* head blight and deoxynivalenol content in durum wheat grain. Europ. J. Plant Pathol. 109(2): 109-115.

Mortensen, K. L., Mellado, E., Lass-Flörl, C., Rodriguez-Tudela, J. L., Johansen, H. K. ,and Arendrup, M. C. 2010. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. Antimicrob. Agents Chemother. 54(11): 4545-4549.

Panwar, V., Gangwar, R. K., Javeria, S., and Yadav, R. S. 2013.Antifungal efficacy of fungicides and bio-control agents against leaf spot pathogens,*Alternaria alternata*. Curr. Discov. 2: 128-133.

Rajesh, K., Pal, S. V., and Anuradha, S. 2014. A study biological control of *Aspergillus flavus* using *Psudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Int. Res. J. of Science & Engineering. 2(6): 213-218.

Ramesh,V. ,and Kumaran,B. 2013.Spermatotoxic effect of hexaconazole in adult rats.*Int.Arch. App.Sci.Technol*. 4(2): 56-61.

Zarn, J. A., Brüschweiler, B. J., and Schlatter, J. R. 2003. Azole fungicide affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterole 14α–demethylase and aromatase. Environ.Health Perspect. 111(3): 225-261.

Detecting of some Fungicides Ability to Induce Resistant Mutations in *Aspergillus amstelodami*

Fadeya M. Al-Hyaly and Huda W. Hadi

Iraq, Mosul University, College of Sciences, Biology Department

Received 29 November 2017 - Accepted 02 August 2018

ABSTRACT

The erroneous and indiscriminate use of fungicides led to increasing resistance of some of these fungicides to many fungi, which posed serious threats to agricultural production. This study investigated the minimum inhibitory concentration (MIC) of both systemic fungicide (Hexaconazol 10% and Prochloraz 25%) on the occurrence of resistant gene mutations in *Aspergillus amstelodami*. Seventeen mutations of spontaneous resistance with an average recurrence of $3.95x10^{-5}$ at (MIC) 300 µg / ml of Hexaconazol, and 20 spontaneous resistant mutations with average recurrence of $4.26x10^{-5}$ at (MIC) 1.25 µg / ml of the Prochloraz were used. The study recorded the isolation of 94 hexaconazol induced nitrous acid -resistant strains with an average frequency of 39.388 $x10^{-5}$ and 100 mutation induced by nitrous acid with an average recurrence of $41.171x10^{-5}$ resistant to the Prochloraz. Two spontaneous mutants, 7 nitrous-induced mutations were resistant to Hexaconazol and cross resistance to Prochloraz, while 8 spontaneous mutations, 15 mutants induced with nitrous acid showed resistance to Prochloraz and cross resistance to Hexaconazol. We conclude from the above that, *A. amstelodami* is able to resist the studied fungicides, as well as the presence of cross-resistance between the strains' resistant to fungicides. This reduces these fungicides importance in the fight against fungi and should be taken into account when using these particular fungicides against fungal infections of the plant.

Key Word: Cross-resistance, Hexaconazol, Nitrous acid, Prochloraz, Strain.