ردیابی مولکولی مقاومت قارچ‌های بیمارگر گیاهان به قارچ‌کش‌ها

محدثه زال[۱] و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا[۲]✉

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲-دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۰۷/۰۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۲/۲۷

زال م. و مستوفی‌زاده‌قلمفرسا ر. ۱۳۹۲ ردیابی مولکولی مقاومت قارچ‌های بیمارگر گیاهان به قارچ‌کش‌ها. *دانش بیماری شناسی گیاهی* ۳(۱): ۵۳-۳۷.

چکیده

بیماری‌های قارچی برای محصولات کشاورزی تهدید عمده‌ای ایجاد می‌کنند، که برای مدیریت آن‌ها از تعداد زیادی قارچ‌کش استفاده می‌شود. ظهور مقاومت عامل مهمی در محدود شدن کارایی قارچ‌کش‌ها است. به طور کلی، قارچ‌کش‌های جذبی نسبت به قارچ‌کش‌های محافظتی بیشتر با مقاومت روبه‌رو می‌شوند. این مقاله سازوکارهای مقاومت به قارچ‌کش‌ها، مانند تغییر جایگاه هدف، کاهش جذب قارچ‌کش، حذف، سم‌زدایی یا تجزیه‌ی متابولیکی قارچ‌کش، را در سطح مولکولی در چند قارچ بیمارگر گیاهی و روش‌های مورد استفاده در تشخیص مولکولی مقاومت قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها، مانند چندشکلی طولی قطعات برشی همراه با پی‌سی‌آر و پی‌سی‌آر اختصاصی آلل، را شرح می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: جذبی، قارچ، قارچ‌کش، مدیریت، مقاومت

✉ مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: rmostofi@shirazu.ac.ir

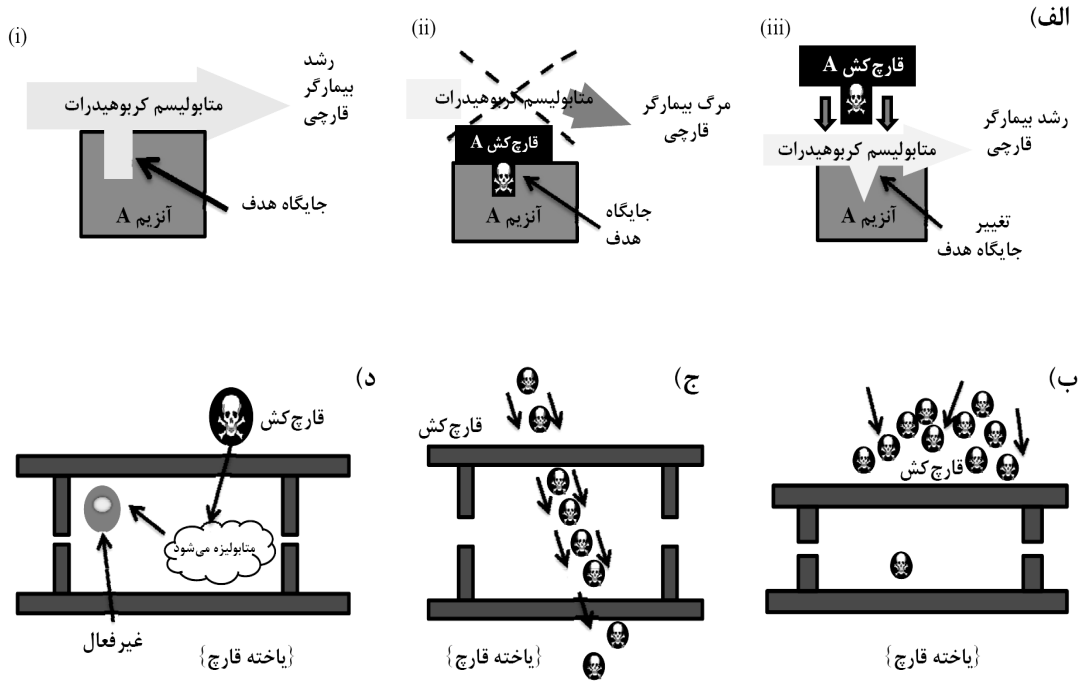
مقدمه

قارچ‌کش‌ها موادی هستند که باعث توقف رشدقارچ‌ها، نمو هاگ‌ها، کشتن اندام‌های قارچی و یا اختلال در فیزیولوژی قارچ‌ها می‌شوند. قارچ‌کش‌ها بر اساس دامنه‌ی اثر بیوشیمیایی خود به ۲ گروه قارچ‌کش‌های دارای یک نقطه اثره و چند نقطه اثره، تقسیم می‌شوند. گروه اول بر چند واکنش فیزیولوژیک در یاخته‌های قارچ اثر می‌گذارند؛ به همین دلیل ایجاد مقاومت در آن‌ها به ندرت روی می‌دهد. قارچ‌کش‌های یک نقطه اثره دارای نقطه اثر اختصاصی هستند و تنها یکی از فرآیندهای یاخته‌ی قارچی را مختل می‌کنند و به دلیل محدود بودن محل اثر آن‌ها، مقاومت به این گروه از قارچ‌کش‌ها به وجود آمده است (رخشانی و طاهری، ۱۳۸۵).

به طور کلی مقاومت قارچ‌های بیمارگر گیاهی به قارچ‌کش‌ها می‌تواند تحت تأثیر کوتاه بودن طول نسل قارچ، هاگ‌آوری فراوان و پراکندگی گسترده‌ی هاگ‌ها باشد (Brent & Hollomon 2007b). مقاومت ممکن است در نتیجه‌ی جهش در ۱ یا چند ژن بروز کند. پس از بروز مقاومت جدایه‌های حساس به قارچ‌کش به خوبی در اثر آن مهار می‌شوند، اما جدایه‌های مقاوم در جمعیت بیمارگر تحت فشار انتخاب در طول زمان غالب می‌شوند. از طرفی مقاومت قارچ می‌تواند پایدار باشد و به نسل‌های بعد آن نیز منتقل شود که این حالت می‌تواند منجر به محدود شدن کارایی و عمر مفید قارچ‌کش شود و مدیریت بیماری را با شکست مواجه کند (Brent & Hollomon 2007a).

بروز مقاومت در قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها همیشه باعث پایداری آن‌ها نمی‌شود، زیرا سازگاری با محیط دراین جدایه‌ها بقای آن‌ها را تعیین می‌کند. از این رو در بسیاری از موارد، جدایه‌های مقاوم ممکن است سازگاری کم‌تر از جدایه‌های حساس داشته باشند. در این صورت آن‌ها حتی در نبود فشار انتخاب قارچ‌کش‌ها نیز نمی‌توانند به خوبی بقا یابند. در این حالت با توقف استفاده از قارچ‌کش‌ها، فراوانی جدایه‌های مقاوم در جمعیت بیمارگر کاهش خواهد یافت. از طرفی جدایه‌های مقاوم می‌توانند سازگارتر از جدایه‌های حساس باشند و در مقایسه با آن‌ها مدت طولانی‌تری در محیط باقی بمانند و مشکلاتی را در مدیریت بیماری به وجود آورند (Ma & Michailides 2005).

مقاومت به قارچ‌کش‌ها با سازوکارهای مختلفی ایجاد می‌شود. این سازوکارها عبارتند از: الف- تغییر جایگاه هدف و کاهش اتصال به قارچ‌کش ؛ ب- کاهش جذب قارچ‌کش؛ ج- حذف و غیرفعال کردن قارچ‌کش قبل از این‌که به جایگاه هدفش برسد؛ د- سم‌زدایی یا تجزیه‌ی متابولیکی قارچ‌کش ؛ ه- تولید یک آنزیم جایگزین آنزیم هدف قارچکش؛ و- تولید بیش از حد مواد یا مولکول‌های هدف قارچ‌کش. علاوه بر این، برخی از سازوکارهایی که هنوز به طور قطع به رسمیت شناخته نشده‌اند نیز می‌توانند مسؤول مقاومت به قارچ‌کش‌ها باشند (شکل ۱).



شکل ۱- الف- تغییر جایگاه هدف: i) آنزیم A برای متابولیسم کربوهیدرات در قارچ لازم است. جایگاه هدف نقطه‌ای است که آنزیم اثر می‌کند. ii) قارچ‌کشA با پر کردن جایگاه هدف آنزیم A در متابولیسم کربوهیدرات اختلال ایجاد می‌کند. iii) در جدایه مقاوم قارچ، تغییر قسمتی از جایگاه، از اتصال قارچ‌کش جلوگیری می‌کند اما به متابولیسم کربوهیدرات اجازه می‌دهد. **ب**- کاهش جذب قارچ‌کش، ج- حذف، د- سم‌زدایی یا تجزیه‌ی متابولیکی قارچ‌کش (ترسیم مجدد بر اساس Buhler 2013).

۱- سازوکارهای مولکولی مقاومت به قارچ‌کش‌ها

سازوکارهای مولکولی مقاومت به قارچ‌کش‌ها در مورد گروه‌های مختلف آن‌ها متفاوت است. در ذیل این سازوکار در گروه‌های مهم و اصلی قارچ‌کش‌ها بررسی می‌شود.

۱-۱- بنزیمیدازول‌ها

بنزیمیدازول‌ها (بنومیل، کاربندازیم، فوبریدازول و تیابندازول) گروه بسیار مهمی از قارچ‌کش‌ها با نقطه اثر اختصاصی و مؤثر روی طیف وسیعی از قارچ‌ها هستند. این گروه اکثراً از رشد میسلیوم جلوگیری می‌کنند و کم‌تر روی جوانه‌زنی هاگ‌ها اثر دارند. به طور کلی بنزیمیدازول‌ها سنتز دی‌اِن‌اِی را در بیمارگر مختل می‌کنند و در مواردی باعث اختلال در میوز و میتوز می‌شوند (رخشانی و طاهری ۱۳۸۵). در بسیاری از قارچ‌ها مقاومت به این قارچ‌کش‌ها گزارش شده است (Ma & Michailides 2005). بررسی‌های انجام شده نشان داد که جهش‌های نقطه‌ای که در ژن بتاتوبولین اتفاق می‌افتد منجر به مقاومت در برابر این قارچ‌کش‌ها شده است. جهش‌های به وجود آمده در این ژن باعث تغییر توالی اسید آمینه در محل اتصال بنزیمیدازول‌ها و عدم تأثیر قارچ‌کش بر قارچ می‌شود. اغلب، تغییر رمزه‌های (Codons) ٦، ٥٠، ١٦٧، ١٩٨، ٢٠٠ و ٢٤٠ ژن بتاتوبولین می‌تواند باعث مقاومت به بنزیمیدازول‌ها در قارچ‌های بیمارگر شود. مثلاً جهشی در توالی ژن بتاتوبولین که منجر به تغییر اسید آمینه‌ی ۲۰۰ می‌شود، باعث مقاومت قارچ *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. به تیابندازول شده است (Ma & Michailides 2005, Sánchez-Torres & Tuset 2011). همچنین جهش در رمزه‌های ٦ و ۱۹۸ به ترتیب منجر به سطح پایین و بالایی از مقاومت قارچ *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey شده است (Ma *et al* 2003). در قارچ *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter جهش در رمزه‌های ۱۹۸ و ۲۰۰ به ترتیب باعث ایجاد سطح مقاومت متوسط و بالایی شد. علاوه بر این، تعویض‌های مختلف در یک رمزه نیز می‌تواند سطوح متفاوتی از مقاومت را به وجود آورد. مثلاً تغییر رمزه‌ی ۱۹۸ از اسیدگلوتامیک به آلانین، گلیسین، لیزین و گلوتامین در قارچ *Tapesia yallundae* Wallwork & Spooner سطوح متفاوتی از مقاومت را ایجاد کرده است (Ma & Michailides 2005).

جدایه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها که از جهش در ژن بتاتوبولین به وجود می‌آیند ممکن است اثرات بازدارندگی چندگرا در دمای بالا و پایین روی رشد قارچ داشته باشند. اثر چندگرا به وضعیتی گفته می‌شود که در آن یک ژن روی بیش از یک فنوتیپ اثر دارد. مثلاً جهشی که در رمزه‌ی ۵۰ ژن بتاتوبولین .*Fusarium moniliforme* J. Sheld اتفاق افتاده بود باعث حساسیت این قارچ به سرما شده است. در حالی که جدایه‌های با مقاومت کم به بنزیمیدازول از قارچ *Monilia laxa* (Ehrenb.) Sacc. & Voglino با یک جهش در رمزه‌ی ۲٤۰، نسبت به دمای بالا حساس بودند (Yan & Dickman 1996). اثرات چندگرا می‌توانند یک نقطه‌ی ضعف انتخابی را در جدایه‌های قارچ تحت شرایط مزرعه به وجود آورند و زمان استفاده از قارچ‌کش را تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال اگر جدایه‌های مقاومی به وجود آمده‌اند که به دمای بالا حساسیت نشان می‌دهند، روزهای گرم بهترین زمان برای استفاده از قارچ‌کش است که در این حالت علاوه بر جدایه‌های حساس، جدایه‌های مقاومی که به درجه حرارت بالا حساس هستند نیز به راحتی تحت تأثیر دمای بالا با قارچ‌کش مهار می‌شوند (Ma & Michailides 2005).

۱-۲ - قارچ‌کش‌های بازدارنده‌ی جداشدن بنیان متیل در تشکیل ارگوسترول (DMIs)

ارگوسترول یکی از استرول‌های مهم در قارچ‌ها است که نقشی مهم و حیاتی در ساختمان و فعالیت غشای یاخته‌های قارچی دارد. اولین قارچ‌کش‌های DMI در سال۱۹۷۰ میلادی مورد استفاده قرار گرفتند ولی از سال ۱۹۸۰ گزارش‌هایی از مقاومت چندین قارچ بیمارگر به این قارچ‌کش‌ها منتشر شد. سازوکارهای مختلفی مسؤول مقاومت به این گروه از قارچ‌کش‌ها عبارتند از:

۱-۲-۱- جهش در ژن (*CYP51*) 14 α-demethylase

یکی از پیش‌ماده‌های ارگوسترول 14 α-demethylase است. پژوهش‌ها نشان‌دهنده‌ی جهش‌های نقطه‌ای در ژن *CYP51* است که باعث تغییر اسید آمینه‌های تولید شده توسط این ژن می‌شود، این تغییرات می‌توانند مسئول مقاومت تعدادی از قارچ‌های بیمارگر به بازدارنده‌های دمتیلاسیون باشند. یکی از جهش‌های شایع در این مورد جهشی در موقعیت رمزه‌ی ۱۳٦، که منجر به جایگزینی فنیل‌آلانین با تیروزین (Y136F) می‌شود، این جهش منجر به ایجاد مقاومت بالایی در

قارچ *Uncinula necator* (Schwein.) Burrill عامل سفیدک پودری انگور، به قارچ‌کش تری‌آدیمنول می‌شود. جهش مذکور همچنین عامل مقاومت قارچ‌های *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (DC.) Speer و *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (DC.) Speer به تری‌آدیمفون است. یکی دیگر از جهش‌ها، جهش *K147Q* است که منجر به ایجاد سطح بسیار بالای مقاومت سفیدک پودری گندم به این قارچکش‌ها می‌شود (Ma & Michailides 2005, Yan *et al* 2009, Wyand & Brown 2005). البته جهش‌های دیگری هم در ژن *CYP51* وجود دارند که می‌توانند منجر به مقاومت *Penicillium italicum* Wehmer و *Ustilago maydis* (DC.) Corda به بازدارنده‌های دمتیلاسیون شوند (Joseph-Horne & Hollomon 1997, Butters *et al* 2000).

۱-۲-۲- بیان بیش از حد ژن *CYP51*

سازوکارهای مختلفی منجر به افزایش سطح بیان ژن *CYP51* و بروز مقاومت قارچ‌ها به قارچ‌کش‌های بازدارنده‌ی دمتیلاسیون می‌شوند. یکی از این سازوکارها افزایش در تعداد نسخه‌ی ژن *CYP51* است که در قارچ *Candida glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow وجود دارد و منجر به مقاومت این قارچ می‌شود (Marichal *et al* 1997). سازوکار بعدی مربوط به حضور تکرارهای متوالی در ناحیه‌ی پیش‌برِ (Promotor) ژن هدف قارچ‌کش است. در آزمایشی جدایه‌های مقاوم و حساس قارچ *P. digitatum* مورد واکاوی قرار گرفتند و مشخص شد که در جدایه‌های مقاوم یک توالی ۱۲٦ جفت‌بازی منحصر به فرد در منطقه‌ی پیش‌بر ژن *CYP51* وجود دارد که این توالی پنج بار پشت سر هم تکرار می‌شود، در حالی که در جدایه‌های حساس فقط یک بار تکرار شده است. برای مشخص شدن این‌که آیا وجود تکرارهای متوالی این توالی عامل مقاومت قارچ *P. digitatum* به بازدارنده‌های دمتیلاسیون است یا نه آزمایش‌هایی طراحی شدند که بتوانند این موضوع را ثابت کنند. در یکی از آزمایش‌ها ژن *CYP51* را که شامل منطقه‌ی پیش‌برِ نیز بود، از جدایه‌های مقاوم به جدایه‌های حساس منتقل کردند و پژوهش‌گران متوجه شدند که در این جدایه‌ها سطح بیان ژن *CYP51* نسبت به جدایه‌های حساس بالاتر رفته و جدایه قارچ مقاوم شده است. مسئله دیگری که وجود داشت این بود که آیا تعداد تکرارها مهم است و در سطح مقاومت به وجود آمده تأثیر دارد. آزمایش‌ها نشان داد که هم در

جدایه‌های حساس و هم در جدایه‌های مقاومی که با انتقال ژن *CYP51* در آزمایشگاه مقاوم شده بودند، وقتی تکرارها را از ۵ به ۲ کاهش دادند سطح بیان ژن *CYP51* و نیز در پی آن سطح مقاومت کاهش یافت. این موضوع مهر تأییدی بود بر این‌که تعداد تکرار قطعه ۱۲٦ جفت‌بازی، بیان ژن *CYP51* را افزایش می‌دهد و در *P. digitatum* موجب مقاومت به بازدارنده‌های دمتیلاسیون می‌شود (Hamamoto *et al*. 2000). سازوکار سوم برای افزایش بیان ژن *CYP51* در *V. inaequalis* مشخص شد. در برخی از جدایه‌های مقاوم، بیان بالای ژن *CYP51*، حاصل از حضور ۵۵۳ جفت باز قرار گرفته در ناحیه‌ی پیش‌برِ است (Schnabel & Jones 2001). چهارمین سازوکار، بیان بیش از حد ژن *CYP51* مربوط به بیمارگر *Blumeriella jaapii* (Rehm) Arx است. واکاوی توالی‌های بالادست ژن *CYP51* در جدایه‌های مقاوم نشان داد که در تمام موارد، اشکال مختلفی از تکرارهای مستقیم کوتاه رتروترانسپوزونی هسته‌ای در این قسمت به صورت پراکنده وجود دارد. در این بیمارگر مقاومت جدایه‌های مقاوم در مقایسه با جدایه‌های حساس از ۵ تا ۱۲ برابر افزایش یافته بود (Ma *et al*. 2006). پنجمین سازوکار، مربوط به حضور هم‌زمان یک توالی خاص و یک جهش نقطه‌ای است. مطالعات نشان داد که در *Aspergillus fumigatus* Fresen. **ترکیبی از یک جهش نقطه‌ای در** t364a**، که** در موقعیت رمزه‌ی ۹۸ ***باعث جایگزینی اسیدآمینه‌ی*** هیستیدین با ***لوسین*** (L98H) می‌شود، و نیز حضور ۲ نسخه از یک توالی ۳٤ جفت بازی متوالی در ناحیه‌ی پیش‌برِ ژن *CYP51*، منجر به افزایش ۸ برابری در سطح بیان ژن *CYP51* در مقایسه با جدایه‌های حساس شده و باعث مقاومت این قارچ به قارچ‌کش‌های آزولی می‌شود (Mellado *et al*. 2007).

سازوکارهای مقاومت جایگزین نیز در مقاومت قارچ‌های بیمارگر گیاهی به بازدارنده‌های دمتیلاسیون نقش دارند. مثلاً مقاومتی که در قارچ‌های *Botrytis cinerea* Pers. و *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J. Schröt. نسبت به بازدارنده‌های دمتیلاسیون به وجود آمده ناشی از بیان بیش از حد انتقال دهنده‌ی ABC (ATP-bindingcassette) است (Hayashi *et al*. 2002, Zwiers *et al*. 2002).

۱-۳- قارچ‌کش‌های دی‌کربوکسیمید (Dicarboximide)

قارچ‌کش‌های دی‌کربوکسیمید نیز در برابر تعداد زیادی از قارچ‌های بیمارگر گیاهی مؤثر هستند. امروزه

جدایه‌های مقاوم به این قارچ‌کش‌ها شناسایی شده و سودمندی این ترکیبات را کاهش داده‌اند (Leroux *et al*. 2002). یکی از سازوکارهای مقاومت به این قارچکش‌ها تداخل در مسیر انتقال سیگنال‌های اسمزی، شامل هیستیدین‌کیناز و مسیر آبشاری مَپ‌کیناز است. مثلاً جهش در ژن هیستیدین‌کیناز موجب ایجاد مقاومت در *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. و *B. cinerea* می‌شود (Yamaguchi & Fujimura 2005). در جدایه‌های مقاوم *U. maydis* (VR43) وجود یک قطعه ۸/۷ کیلوبازی باعث مقاومت به وینکلوزلین شناخته شده است. این قطعه‌ی ۸/۷ کیلوبازی از یک کادر خواندنی باز ۱۲۱۸ جفت بازی تشکیل شده که شامل ژن *adr-1* است و برای پروتئین‌کیناز سرین/ ترئونین رمزگذاری شده، که نقش به سزایی در ایجاد مقاومت دارد (Orth *et al*. 1995).

۲- ردیابی مولکولی مقاومت به قارچکش‌ها در قارچ‌های بیمارگر گیاهان

روش‌های مختلفی برای شناسایی مقاومت در قارچ‌ها وجود دارد. همه‌ی این روش‌ها دارای معایب و محاسنی هستند که استفاده از آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مثلاً بعضی از آن‌ها وقت‌گیر و پر زحمت هستند، دقت پایینی دارند یا نتایج آن‌ها تا حدودی دارای خطا و بعضی دیگر سریع و دقیق ولی گران هستند. آزمون‌های زیست‌سنجی مقاومت به قارچ‌کش‌ها معمولاً با روش‌هایی مانند بررسی رشد ریسه قارچ و جوانه‌زنی هاگ در حضور قارچکش، در شرایط درون شیشه‌ای و آزمون مایه‌زنی گیاهان با بیمارگر و استفاده از قارچکش، انجام می‌شوند. این روش‌های سنتی، کارا ولی وقت‌گیر هستند، ضمن اینکه شناسایی جدایه‌های مقاوم بیمارگرهای انگل اجباری گیاهان مانند سفیدک‌های پودری و کرکی و همچنین قارچ‌های کند رشدی مانند *Venturia* spp. به این روش‌ها مشکل است (Ishii 2002). برای رفع این مشکلات استفاده از روش‌های مولکولی رواج یافته‌اند. از روش‌های مولکولی مورد استفاده برای تشخیص جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها به روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده (پی‌سی‌آر)، چند شکلی طولی قطعات برشی همراه با پی‌سی‌آر، پی‌سی‌آر اختصاصی آلل (Allele specific-PCR) و پی‌سی‌آر بی‌درنگ اختصاصی آلل (Allele specific real-time PCR) اشاره کرد. در این قسمت چند نمونه از روش‌های مولکولی در تشخیص مقاومت بیمارگرهای گیاهی به قارچکش‌ها شرح داده می‌شود.

۲-۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز منجر به تکثیر انتخابی ناحیه‌ی خاصی از مولکول دی‌اِن‌اِی می‌شود. هر ناحیه از هر مولکول دی‌اِن‌اِی را می‌توان انتخاب نمود به شرط آن‌که توالی ۲ انتهای آن مشخص باشد. با استفاده از توالی این نواحی انتهایی می‌توان آغازگرهایی اختصاصی طراحی کرد و آن‌ها را در چرخه‌ی فرایند تکثیری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به کار برد. در این صورت هنگام فزون‌سازی دی‌اِن‌اِی، تنها قطعه‌ی هدف تکثیر خواهد شد. در قارچ *P. digitatum* بیان بیش از حد ژن *PdCYP51* باعث ایجاد مقاومت آن DMIs شده بود. بررسی‌ها با این روش نشان داد که وجود پنج نسخه از یک توالی تکراری ۱۲۶ جفت بازی افزایش دهنده‌ی ترانویسی در ناحیه‌ی پیش بر ژن باعث بیان بیش از اندازه‌ی این ژن شده است. به همین دلیل ژن *PdCYP51* توالی‌سنجی شد و بر اساس آن یک جفت آغازگر پی‌سی‌آر (Pri-38c و Pri-207) طراحی شد. این آغازگرها در جدایه‌های حساس و مقاوم به ترتیب یک قطعه ۲۵۰ و ۷۵۰ جفت بازی را فزون‌سازی می‌کردند. این روش ظرف مدت ۵ تا ٦ ساعت امکان تشخیص جدایه‌های حساس و مقاوم را فراهم می‌آورد (Hamamoto *et al*. 2001).

۲-۲- چندشکلی طولی قطعات برشی (آرافِ‌اِل‌پی RFLP همراه با پی‌سی‌آر)

نشانگرهای چندشکلی طولی قطعات برشی از طریق هضم آنزیمی تولید می‌شوند. روش آرافِ‌اِل‌پی همراه با پی‌سی‌آر یک روش کمّی برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای است که در اثر تغییر محل آنزیم برشی به وجود می‌آید. در این روش دی‌اِن‌اِی جدایه‌های حساس و مقاوم با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز فزون‌سازی شده، سپس با یک آنزیم برشی بریده می‌شود. به دلیل این‌که جهش‌های نقطه‌ای باعث تغییر اسیدهای آمینه می‌شوند، ممکن است محل برش آنزیم برشی تغییر کند. در این صورت قطعاتی از دی‌اِن‌اِی با طول‌های متفاوت تولید خواهد شد و از این طریق مقاومت به وجود آمده تشخیص داده می‌شود (فارسی و باقری، ۱۳۸۸). آزمایش‌هایی برای شناسایی جدایه‌های مقاوم *M. laxa* به بنزیمیدازول در درختان هسته‌دار و بادام در کالیفرنیا به این روش انجام شده است. در این بررسی‌ها ژنوم جدایه‌های مقاوم و حساس این قارچ توالی‌سنجی و مشخص شده که یک جهش نقطه‌ای در موقعیت اسید آمینه‌ی ۲٤۰ در ژن بتاتوبولین اتفاق افتاده است

که باعث جایگزینی فنیل‌آلانین با لوسین می‌شود. بر اساس تفاوت در توالی دی‌اِن‌اِی در اینترون ٦ ژن بتاتوبولین قارچ ، یک جفت آغازگر اختصاصی پی‌سی‌آر برای *M. laxa* طراحی شد. این آغازگرها یک قطعه‌ی ۳۷٦ جفت بازی از دی‌اِن‌اِی همه‌ی جدایه‌های *M. laxa* مورد آزمایش را تکثیر می‌کنند. محدوده‌ی اثر آنزیم برشی *BsmA I*، توالی GTCTCC است. در محصولات پی‌سی‌آر جدایه‌های حساس توالی مذکور وجود دارد که با آنزیم برشی *BsmA I* بریده می‌شود. در حالی که در جدایه‌های مقاوم به دلیل جهش نقطه‌ای که در ژنوم آن اتفاق افتاده این توالی به GTTTCC تغییر کرده که این موجب عدم شناسایی توسط آنزیم *BsmA I* می‌شود. به همین دلیل اندونوکلئاز، قطعه ۳۷٦ جفت بازی حاصل از پی‌سی‌آر جدایه‌های حساس دو نوار ۱۱۱ و ۲٦۵ جفت بازی را در ژل آگارز به وجود می‌آورد. در حالی که در جدایه‌های مقاوم به دلیل این که این قطعه شکسته نمی‌شود، فقط یک نوار را روی ژل آگارز ایجاد می‌کند. به این ترتیب روش چندشکلی طولی قطعات برشی همراه با پی‌سی‌آر برای شناسایی سریع جدایه‌های مقاوم *M. laxa*، *B. cinerea*، *Cladobotryum dendroides* (Bull.) W. Gams & Hooz. *A. solani*، به بنزیمیدازول و جدایه‌های مقاوم قارچ *A. alternata*، *Alternaria tenuissima* (Kunze) Wiltshire، *Alternaria arborescens* E.G. Simmons به آزوکسی‌استروبین و قارچ‌های *B. graminis* f. sp. *hordei*، *B. graminis* f. sp. *tritici* و *P. fusca* به استروبیلورین ابداع شده است (Ma & Michailides 2005).

۲-۳- پی‌سی‌آر اختصاصی آلل و پی‌سی‌آر بی‌درنگ اختصاصی آلل کمّی

پی‌سی‌آر اختصاصی آلل روش ساده و سریعی برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای است. معمولاً یکی از ۲ آغازگر پی‌سی‌آر در پی‌سی‌آر اختصاصی آلل مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش برای تشخیص قارچ *M. laxa* با مقاومت کم به بنزیمیدازول استفاده می‌شود (Ma & Michailides 2005).

پی‌سی‌آر بی‌درنگ روشی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در طول زمان است. این روش بر مبنای میزان پرتوی فلورسان تولیدی از مولکول گزارش‌گر (Reporter) بنا شده که در طول واکنش افزایش می‌یابد. مولکول‌های گزارش‌گر فلورسان یا به صورت رنگ‌هایی است که به دی‌اِن‌اِی دو رشته‌ای متصل می‌شوند (مانند سیبرگرین

"SYBR® Green") و یا به صورت شناساگرهای توالی‌های خاص (مانند کاوشگرهای تَک‌من "TaqMan® Probes") هستند. این روش می‌تواند با حداقل میزان اسیدنوکلئیک آغاز شود و مقدار تولید نهایی را با دقت زیادی تعیین نماید. دقت و حساسیت این روش بالاتر از پی‌سی‌آر معمولی است. همچنین توانایی تشخیص مرحله‌ی گسترش در پی‌سی‌آر را در مراحل اولیه‌ی واکنش دارد، در حالی که تشخیص در پی‌سی‌آر معمولی در مرحله‌ی نهایی واکنش صورت می‌گیرد. مثلاً مقاومت قارچ *P. digitatum* به آزوکسی‌استروبین که ناشی از یک جهش نقطه‌ای است با این روش مشخص شده است (Zhang *et al*. 2009). در قارچ *B. graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) برای تشخیص خاص آن، آغازگرهای R-Bgt + F-Bgt طراحی شدند. همچنین بر اساس توالی اینترون ژن *CYP51*، یک جفت آغازگر پی‌سی‌آر، Bgt136-F + Bgt136-R برای ردیابی خاص از جهش Y136F طراحی و با استفاده از این دو جفت آغازگر، روش پی‌سی‌آر بی‌درنگ برای تعیین سریع جمعیت جدایه‌های مقاوم به DMIs، در نمونه‌های مزرعه‌ای ابداع شده است. پی‌سی‌آر اختصاصی آلل یک روش کمّی نیست و فقط می‌تواند حضور قارچ مقاوم به قارچ‌کش را تشخیص دهد. در این حال روش پی‌سی‌آر بی‌درنگ می‌تواند برای تعیین کمّی دی‌اِن‌اِی هدف در نمونه مورد استفاده قرار گیرد. به همین دلیل این دو روش را با هم ترکیب کرده‌اند و روش "پی‌سی‌آر بی‌درنگ اختصاصی آلل کمّی" به وجود آمده که قادر است هم حضور جدایه مقاوم قارچ و هم جمعیت آن را تعیین کند. این روش، سریع، دقیق، مقرون به صرفه و دارای قابلیت استفاده‌ی زیاد برای آزمون‌های معمولی است(Yan *et al*. 2009).

نتیجه

امروزه حفاظت از گیاهان با استفاده از قارچ‌کش‌ها، برای تولید محصول کافی ضروری است. ولی بروز مقاومت به قارچ‌کش‌ها یک مشکل مهم در کشاورزی مدرن است و برای جلوگیری و یا حداقل به تأخیر انداختن زمان شروع ایجاد مقاومت، استفاده‌ی درست از قارچ‌کش ضروری است. برای اعمال مدیریتی کاراتر، بهتر است از قارچ‌کش‌های دارای چند نقطه‌ی اثر استفاده شود. همچنین می‌توان از یک قارچ‌کش اختصاصی به همراه قارچ‌کشی عمومی، به ویژه قارچ‌کش‌های حفاظتی، استفاده کرد. شیوه‌ی دیگری که برای مدیریت مقاومت به قارچ‌کش‌ها وجود دارد استفاده‌ی متناوب از

قارچ‌کش‌هایی است که نقطه اثر بیوشیمایی متفاوتی دارند و مسیرهای بیوشیمایی متفاوتی را هدف می‌گیرند. در نهایت استفاده از قارچ‌کش‌ها، به عنوان جزئی از مدیریت تلفیقی قارچ‌های بیمارگر گیاهی، به همراه سایر روش‌های مدیریتی موجب بهینه‌سازی مصرف و جلوگیری از مقاومت به قارچ‌کش خواهد شد. مقاومت به قارچ‌کش می‌تواند توسط سازوکارهای مختلف به وجود آید، اما تغییر جایگاه هدف بیوشیمیایی قارچ‌کش شایع‌ترین سازوکار مقاومت قارچ‌ها به قارچ‌کش‌ها است. با ابداع روش‌های مولکولی مبنی بر این سازوکار، حال می‌توان به سرعت جدایه‌های مقاوم را تشخیص داد. این روش‌ها به دلیل سرعت تشخیص بالای خود، کاربرد زیادی پیدا کرده‌اند. اکثر این روش‌ها ظرف مدت چند ساعت قادر به تشخیص مقاومت در قارچ‌ها هستند، به همین دلیل می‌توان روند پیشرفت و تکامل مقاومت را ارزیابی کرد و متناسب با آن راه‌بردهای مدیریت مقاومت را به طور مؤثرتری به کار برد و هر جا که لازم باشد استفاده از قارچ‌کش را متوقف کرد و یا به صورت متناوب و یا ترکیب با سایر قارچ‌کش‌ها مورد استفاده قرار داد و از ایجاد آلودگی و مقاومت بیش‌تر جلوگیری به عمل آورد. انجام دقیق و به موقع برنامه‌های مدیریت، خطر شیوع بیماری را کاهش خواهد داد و در نتیجه می‌توان محصولاتی با کمیت و کیفیت بالاتر تولید کرد. به کارگیری روش‌های جدید تشخیص، علاوه بر کمک به مدیریت بروز مقاومت در قارچ‌ها، به استفاده‌ی مؤثرتر از قارچ‌کش‌ها و کاهش اثرات زیان‌بار زیست محیطی آن‌ها نیز منجرخواهد شد.

منابع References

رخشانی الف. و طاهری ع .۱۳۸۵. اصول سم‌شناسی کشاورزی، جلد دوم: قارچ‌کش‌ها، باکتری‌کش‌ها و نماتدکش‌های بیولوژیک. فرهنگ جامع، تهران، ایران. ٤٤٦ ص.

فارسی م. و باقری ع. ۱۳۸۸. اصول اصلاح نباتات. جهاد دانشگاهی مشهد، ۳٦۸ ص.

Avila-Adame C. & Köller W. 2003. Characterization of spontaneous mutants of *Magnaporthe grisea* expressing stable resistance to the Qo-inhibiting fungicide azoxystrobin. *Current Genet*ic 42: 332–338.

Bartlett D.W., Clough J. M., Godwin J. R., Hall A. A., Hamer M. & Parr-Dobrzanski B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649–662.

Blum M., Waldner M. & Gisi U. 2010. A single point mutation in the novel PvCesA3 gene confers resistance to the carboxylic acid amide fungicide mandipropamid in *Plasmopara viticola*. *Fungal Genetics and Biology* 47: 499–510.

Brent K. J. & Hollomon D. W. 2007a. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be managed . The Fungicide Resistance Action Committee. FRAC Monograph No. 1. Aimprint, England, 28p.

Brent K. J. & Hollomon D. W. 2007b. Fungicide Resistance: the Assessment of Risk. The Fungicide Resistance Action Committee. FRAC Monograph No. 2. Aimprint, England, 60p.

Buhler W. 2013. Mechanisms of fungicide resistance. Online: http://pesticidestewardship.org/resistance/FungicideResistance/Pages/Mechanisms-of-Fungicide-Resistance.aspx.

Butters J. A., Zhou M. & Hollomon D. W. 2000. The mechanism of resistance to sterol 14α-demethylation inhibitors in a mutant (Erg 40) of *Ustilago maydis*. *Pest Management Science* 56: 257–263.

Cools H. J., Ishii H. & Hollomon D. W. 2002. Cloning and sequence analysis of the eburicol 14α-demethylase encoding gene (CYP51) from the Japanese fungus *Venturia nashicola*. *Phytopathology* 150:444–450.

Deising H. B., Reimann S. & Pascholati S. F. 2008. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:286–295.

De Miccolis Angelini R. M., Rotolo C., Masiello M., Pollastro S., Ishii H. & Faretra F. 2012. Genetic analysis and molecular characterisation of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. *Pest Management Science* 68:1231–1240.

Fernández-Ortuño D., Torés J.A., De Vicente A. & Pérez-García A. 2008a. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology* 11:1-9.

Fernández-Ortuño D., Torés J. A., De Vicente A. & Pérez-García A. 2008b. Field resistance to QoI fungicides in *Podosphaera fusca* is not supported by typical mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Pest Management Science* 64: 694–702.

Fisher N., Brown C. A., Sexton G., Cook A., Windass J. & Meunier B. 2004. Modeling the Qo site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome b. *European Journal of Biochemistry* 271:2264–2271.

Fraaije B. A., Butters J. A., Coelho J. M., Johes D. R. & Hollomon D. W. 2002. Following the dynamics of strobilurin resistance in *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* using quantitative

allele-specific real-time PCR measurements with the fluorescent dye SYBR green I. *Plant Pathology* 51: 45–54.

Gisi U., Sierotzki H., Cook A. & McCaffery A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science* 58: 859–867.

Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee Y.J., Makizumi Y., Akutsu K. & Hibi T. 2000. Tandem repeat of a transcriptional enhancer upstream of the sterol 14α-demethylase gene (CYP51) in *Penicillium digitatum*. *Applied and Envirnonmenta Microbiology* 66: 3421–3426.

Hamamoto H., Hasegawa K., Nakaune R., Lee, Y. J., Akutsu K. & Hibi T. 2001. PCR-based detection of sterol demethylation inhitor-resistant strains of *Penicillium digitatum*. *Pest Management Science* 57:839–843.

Hayashi K., Schoonbeek H. & De Waard M. A. 2002. Expression of the ABC transporter BcatrD from *Botrytis cinerea* reduces sensitivity to sterol demethylation inhibitor fungicides. *Pesticides Biochemistry and Physiology* 73:110–121.

Ishii H. 2002. DNA-based approaches for diagnosis of fungicide resistance. *American Chemical Society* 808:242–259.

Joseph-Horne T. & Hollomon D. W. 1997. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 149: 141–149.

Kawchuk L. M., Hutchison L.J., Verhaeghe C.A., Lynch D.R., Bains P.S. & Holley J. D. 2002. Isolation of the b-tubulin gene and characterization of thiabendazole resistance in *Gibberella pulicaris*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 233–238.

Kim Y. S., Dixon E.W., Vincelli P. & Farman M. L. 2003. Field resistance to strobilurin (QoI) fungicides in *Pyricularia grisea* caused by mutations in the mitochondrial cytochrome b gene. *Phytopathology* 93: 891–900.

Leroux P., Fritz R., Debieu D., Albertini C., Lanen C., Bach J., Gredt M. & Chapeland F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58: 876–888.

Leroux P., Gredt M., Leroch M. & Walker A. 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6615–6630.

Ma Z., Yoshimura M. & Michailides T. J. 2003. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone fruit orchards in California. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7145–7152.

Ma Z. & Michailides T. J. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 24: 853–863.

Ma Z., Proffer T. J., Jacobs J. L. & Sundin G. W. 2006. Overexpression of the 14α-Demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2581–2585.

Marichal P., Van den Bossche V., Odds F.C., Nobels G., Warnock D. W., Timmerman V., Broeckhoven C., Fay S. & Mose-Larsen P. 1997. Molecular biological characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 41: 2229–2237.

Mellado E., Garcia-Effron G., Alcázar-Fuoli L., Melchers W. J. G., Verweij P. E., Cuenca-Estrella M. & Rodríguez-Tudela J. L. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 51: 1897–1904.

Miguez M., Reeve C., Wood P. M. & Hollomon D. W. 2004. Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to QoI fungicides. *Pest Management Science* 60:3–7.

Miles T. D., Miles L. A., Fairchild K. L. & Wharton P. S. 2013. Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani. Plant Pathology* 10:12077.

Orth A. B., Rzhetskaya M., Pell E. J. & Tien M. 1995. A serine (threonine) protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2341–2345.

Sánchez-Torres P. & Tuset J.J. 2011. Molecular insights into fungicide resistance in sensitive and resistant *Penicillium digitatum* strains infecting citrus. *Postharvest Biology and Technology* 59:159–165.

Schnabel G. & Jones A. L. 2001. The 14α-demethylase (CYP51A1) gene is overexpressed in *Venturia inaequalis* strains resistance to myclobutanil. *Phytopathology* 91: 102–110.

Wood H. M., Dickinson M. J., Lucas J. A. & Dyer P. S. 2001. Cloning of the CYP51 gene from the eyespot pathogen *Tapesia yallundae* indicates that resistance to the DMI fungicide prochloraz is not related to sequence changes in the gene encoding the target site enzyme. *FEMS Microbiology Letters* 196:183–187.

Wood P. M. & Hollomon D. W. 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Management Science* 59:499–511.

Wyand R. A. & Brown J. K. M. 2005. Sequence variation in the *CYP51* gene of *Blumeria graminis* associated with resistance to sterol demethylase inhibiting fungicides. *Fungal Genetics and Biology* 42:726–735.

Yamaguchi I. & Fujimura M. 2005. Recent topics on action mechanisms of fungicides. *Journal of Pesticide Science* 30: 67–74.

Yan K. & Dickman M. B. 1996. Isolation of a b-tubulin gene from *Fusarium moniliforme* that confers cold-sensitive benomyl resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3053–3056.

Yan L., Yang Q., Zhou Y., Duan X. & Ma Z. 2009. A real-time PCR assay for quantification of the Y136F allele in the CYP51 gene associated with *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* resistance to sterol demethylase inhibitors. *Crop Protection* 28:376–380.

Zhang Z., Zhu Z., Ma Z. & Li H. 2009. A molecular mechanism of azoxystrobin resistance in *Penicillium digitatum* UV mutants and a PCR-based assay for detection of azoxystrobin-resistant strains in packing- or store-house isolates. *International Journal of Food Microbiology* 131:157–161.

Zwiers L. H., Stergiopoulos I., Van Nistelrooy J. G. M. & De Waard M. A. 2002. ABC transporters and azole susceptibility on laboratory strains of the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 46:3900–3906.

Molecular Detection of Fungicides Resistance in Phytopathogenic Fungi

MOHADDESEH ZAL[1] & REZA MOSTOWFIZADEH GHALAMFARSA[2]✉

1-MSc. Student of Biotechnology, Department of Biotechnology,
Collage of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2-Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection,
Collage of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
(✉Corresponding author,E. mail:rmostofi@shirazu.ac.ir).

Zal M. & Mostowfizadeh Ghalamfarsa R. 2014. Molecular detection of fungicides resistance in phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Science* 3(1):37-53.

Abstract

Fungal diseases of plants are major treats for agricultural products. Lots of fungicides are widely used to control the plant pathogens. Incidence of resistance to the fungicides in the pathogenic fungi is a main limitation in their use. With some exceptions, in general, there are more reports on the resistance of fungi to systemic fungicides than the non-systemic ones. This review discusses the mechanisms of resistance to chemical fungicides (*e.g.* altering the target site, reducing the fungicide uptake, fungicide removal, detoxification or metabolism of the fungicide) in some phytopathogenic fungi at the molecular level and describes the methods (*e.g.* RFLP-PCR, and allele specific real-time PCR) used in molecular detection of resistance to the fungicides.

Key words: Systemic, Fungus, Fungicide, Management, Resistance