التشخيص الجزيئي للجين المسؤول عن انتاج سم الافلا B1 المنتج من قبل الفطر *Aspergillus flavus*

Muna A. Alrawi **Halima Z. Hussein**
University of Baghdad, College of Agricultural Engineering Sciences, Department of Plant Protection Baghdad, Iraq
Muna.abdulrahman91@yahoo.com
drhalima@coagri.uobaghdad.edu.i

مستخلص البحث:
يعتبر الفطر *Aspergillusflavus*منالفطريات الشديدة السمية ينتج عدة أنواع من السموم الفطرية ويمثل الأفلاتوكسين B1 السم الأكثر سمية و يسبب امرض شديدة حتى في أدنى التركيز أقل من 10 جزء في المليون. تشخيص إنتاج السم اعتمادا على الخصائص المظهرية والبنية المجهرية يعتبر تشخيص غير مستقر وقابل للتغيير في ظل الظروف البيئية. لذلك يتم استخدام التقنيات الجزيئية والبيولوجية مثل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لإعطاء تشخيص دقيق وللكشف عن الجينات المسؤولة عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين. في هذه الدراسة، تم تقديرتركيز الأفلاتوكسين B1 باستخدام تقنية HPLC، كمية السم مرتبطة بعدد الجينات ،ويعد الكشف عن الجين المسؤول عن التخليق الحيوي AFB1 باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسلPCR استنادا إلى تسلسل مناطق ITSتعبر وسيلة معقولةتظهر جينوم A. flavusو جين تخليق الأفلاتوكسين afIRو يمكن استخدام هذه النتيجة لفهم السيطرة الوراثية على الأفلاتوكسين بشكل أفضل وتقليل مخاطرة.

المقدمة:
السموم الفطرية هي منتجات ايض ثانوية سامة للفطريات التي تنتجها أنواع مختلفة من الفطريات التي تلوث الطعام والأعلاف. يعتبر الأفلاتوكسين النوع الأكثر شيوعا من السموم الفطرية ينتمي إلى عائلة ديكيتيداتdeketides ويتم إنتاجه بشكل رئيسي بواسطة Aspergillus genus مثل (A.flavus و A.nomius و A. paraciticus و A. oryzae و A. sojae) [1,2,3].
الأفلاتوكسينات هي مجموعة من عشرين منتجا أيضيا (مركب) وأهم السموم الفطرية هي (الأفلاتوكسين B1 وB2 وG1 وG2) [4]. الأفلاتوكسين B1 له تأثير عالي السمية للكبد ، ومسبب للطفرات الجينية ، ومسرطن ،ومسسبب للتشوهات الخلقيةعند تناوله أو استنشاقه أو امتصاصه من خلال الجلد في كل من الإنسان والحيوان، ويسبب أمراضا خطيرة حتى مع الحد الأدنى من التراكيز[5، 6، 7]. كشف Yu وآخرون، 2004 أن المسار الجيني للتخليق الحيوي للأفلاتوكسين يتكون من حوالي 25 جينا وأن الجينات السائدة هي afIR و afIS و afIP و afIQ و afID و afIO و afIM. يعتبر التحديد الجزيئي والتحليل الجيني للمنطقة ITSوسيلة مفيدة وحساسة تبين التغاير بين بين الأنواع المختلفة، لذلك يوفر هذا التسلسل معلومات تصنيفية حول نوع بيئي معين [8، 9، 10]. ويمكن القول انتقنية تفاعل البلمرة المتسلسل تعتبر أداة تحليلية موثوقة وحساسة يمكن استخدامها للكشف عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين والتعبير الجيني واغلقت الكثير من الثغرات التي خلفها التوصيف المورفولوجي والكيميائي الحيوي. [11، 12، 13].

المواد والطريقة:

كشف عن الأفلاتوكسين B1 والتحديد الكمي:

عزل الفطريات التي تم الحصول عليها من مختبر السموم الفطرية / كلية الزراعة، جامعة بغداد. بعد تنميتها في وسط الأرز واستخلص الأفلاتوكسين B1 باتباع الطرق المرجعية [14]. تم الكشف عن السموم نوعياً باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)بمطابقة معامل الترحيل RFوملاحظة لون التألق وشدتهُ مع المادة القياسية[15,16]. وتم قياس وتقدير المحتوى الكميباستخدام تقنية الكروماتوغرافيا السائل عالي الاداءوأستعمل عمود فصل من نوع ODS – C18 والطور المتحرك مكون من اسيتونتريل و ماء مقطر وحامض الخليك الثلجيالممزوج في الخلاط قبل الاستخدام والتخلص من الفقاعات الغازية في الخليط واستخدام حقن المذيبات عن طريق مزج 100 مل من الأسيتون إنزال و 900 مل من الماء المقطر و 10 مل من ثلج حمض الخليك.

تحضير تفاعل البلمرة المتسلسلPCR :

تم إعداد تفاعل البلمرة المتسلسل بأستخدام منطقة النسخ البينية ITS4-ITS1 للجين الرايبوسومي rRNA 18sلأجراء تفاعل تضخيم السلسلة وكان تسلسل البادئ المستخدم مبين في الجدول (1).

جدول 1 :البادئ المستخدم في تفاعل تضخيم سلسلة منطقة النسخ البينيةITS4-IT [17].

Gene	Primer	Sequence
18S	ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
18S	ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'

تم استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل على نطاق واسع لتشخيص الجين المسؤول عن التخليق الحيوي للأفلاتوكسين[18، 19]. Sweeny وأخرون، 2000 أشاروا إلى وجود ارتباط كبير بين إنتاج الأفلاتوكسين بواسطة A. flavus والتعبير عن afIR. كما وفر التعبير الجيني لـafIR تفريقواضح بين الأفلاتوكسين والسلالات غير السامة من Aspegillusflavus. [20]. تم الكشف عن الجين المسؤول عن إنتاج AFB1 عن طريق استخدام الحمض النووي المستخرج مع إضافة البادئات (الجدول: 2) واستخدمت العدة القياسية المجهزة من شركةPromegaالكندية وحضر مزيج التفاعل بحجم نهائي 20 مايكروليتر. تم نقل العينات إلى جهاز البلمرة الحرارية بعد برمجتها على التفاعل وإجري الرحلان الترحيل الكهربائيelctrophoreses لمنتجات تفاعل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

الجدول 2 :البادئ المستخدم في تفاعل تشخيص الجين المسؤول عن انتاج السم.

Primer	Sequence
*aflR*Taq1	TCGTCCTTATCGTTCTCAAGG
*aflR*Taq2	ACTGTTGCTACAGCTGCCACT

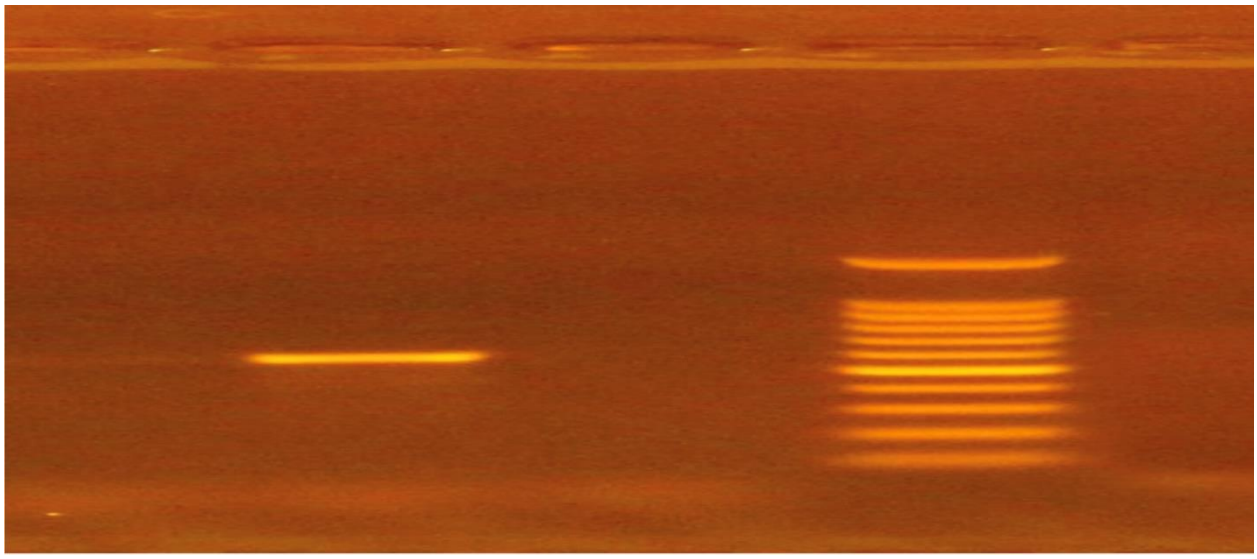
النتائج والمناقشة:

الكشف عن الأفلاتوكسين B1 باستخدام TLC والتحديد الكمي باستخدام HPLC

أظهرت نتائج الكشف عن AFB1 باستخدام TLC ومقارنة مع السم القياسيAFB1 قدرة العزل على إنتاج الأفلاتوكسين B1 حيث ظهرت البقع المتوهجة باللون الازرق وتم تأكيد الكشف عند رش الصفائح بحامض الكبرييك بتركيز 50 %أذ اظهرت البقع باللون الاصفر عند الفحص تحت الاشعة فوق البنفسجية.، وأظهرت نتيجة القياس الكمي بواسطة HPLC أن عزل الفطريات كان منتجة لـAFB1وبتركيز 3 ميكروغرام / غرام،أظهرت هذه النتيجة جنبا إلى جنب مع الدراسات السابقة أن A. flavus قادرة على إنتاج الأفلاتوكسين (AF) بتركيزات أعلى: AFB1: 18.6-70000 جزء في المليون [21، 22].

التشخيص الجزيئي للجين المسؤول عن إنتاج AFB1

أظهر تحليل نتائج تضاعف الـ DNAعلى هلام الاكاروز تفاعلاً موجباً مع الـ DNAالمستخلص من عزلة الفطر، أذ ظهرت حزمة واحدة على الهلام بوزن جزيئي مقداره ~ 550 (pbزوج من القواعد)الشكل 1، و أوضحت نتائج تفاعل الـ PCRأن عزلة الفطرAspergillusflavusتمتلك الجين) AFB1 the gene regulatory biosynthesis (aflRممايدل على قدرتها على انتاج سم AFB1وكذلك مسؤوليتها عن تفعيل النسخ لمعظم ان لم يكن لجميع الجينات الهيكلية للمعقد الجيني في مسار تصنيعالافلاتوكسين
[23 و24 و25 و26 و27 و28].



الشكل (1): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لناتج تضاعف الـ DNAلعزلة الفطرA.flavus

الاستنتاجات :

ثبت أن الجين المسؤول عن أنتاج سم الافلاتوكسين B1 من قبل الفطر *Aspergillusflavus* هوafIR

التوصيات:

أمكانية استخدام جسيمات الفضة النانوية في كبح الجين المسؤول عن انتاج السم افلا B1 من الفطر.

المصادر:

1-Bryden WL, (2007). Mycotoxin in the food chain: human health implications. Asia Pac J ClinNutr 16 Suppl 1:95-101.
2-Levin RE, (2012). PCR detection of aflatoxin producing fungi and its limitations. Int J Food Microbial 156- 66.
3-Naseem MN, Saleemi MK, Khan A, et al., (2018). Pathological effects of concurrent administration of aflatoxin B1 and fowl adenovirus-4 in broiler chicks. Microbial Pathogen 121:47-154.
4-Vidal, A., Marin, S., Sanchis, V. (2018).Hydrolysers of modified mycotoxins in maize: a'- Amylase and cellulose induce an underestimation of the total aflatoxin content.
Food chemistry 248:86-92.
5-Meggs WJ, (2009). Epidemics of mold poisoning past and present. Tox. Health 25:9-10.
6 -Anwar, U.H., Maqbool, U., Ahamed, M., and Iqbal, M.M. (2004) . Determination of aflatoxin-B1in poultry feed and its components employing enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Toxicol.Environ. Chem. 86:213-218.
7-Saleemi MK, Khan MZ and Khan A, (2012) . Molecular identification of black Aspergilla isolated from poultry feeds by sequencing their ITS region. Pak Vet J 32:171-4.
8-
Jana,M.U.,Dalling,J.W.,Gallery,R.E.,Maddisson,D.R.,Davis,E.C.,Gibson,C. M.,and Arnold,A.E.(2009). Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a neotropical pioneer tree: a case study for analyzing fungal environmental samples. Mycological Research, 15: 1-18.
9-Imran ZK, Al-Rubaay AA (2014). Molecular ecological typing of environmental isolates of Aspergillusterreus collected from desert regions in Iraq. International Journal of Advanced Research. 2(3): 1041-1047.
10-Jogee PS, Ingle AP and Rai M, (2017). Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. Food Control 71:143-51.
11-Miranda M, Marcela M, Rosero-Moreano M, et al., 2019. Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxin in arepa, bread and rice. Food Control 98:359-66.
12-Zhang, Z.G.; Zhang, J.Y.; Zheng, X.B.; Yang, Y.W. and Ko, W.H. (2004). Molecular distinctions between Phytophthoracapsici and Ph.

tropicalis based on ITS sequences of ribosomal DNA. Journal of phytopathology, 152(6): 358-364.
13 -Jogee PS, Ingle AP and Rai M, 2017. Isolation and identification of toxigenic fungi from infected peanuts and efficacy of silver nanoparticles against them. Food Control 71:143-51.
14-AOAC. (2005). Association of official analytical chemist, Chapter 49, Gaithersburg, MD.
15-Sobolev, V.S., Dorner, J.W. (2002). Cleanup procedure for determination of aflatoxin major agricultural commodities by liquid chromatography .Journal AOAC international 85:642-645.
16-Cocker, R.D.,Jones,B.D.,Nagler,M.J.,Gillmam,g.a.,Walbridge, Garand Pangrahi,A.J.(1984). Mycotoxin training manual. Tropical development and research institute overseas development administration, pp-35.
-17 Bellemain E, Carlson T, Brahman C, Coissac E, Taberlet P, Kauserud H (2010). IT'S as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology: 10-189.
18-Monomania HK, Anand S, Chandrashekar A, et al., 2005. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. Process. Biochem 40:2859- 64.
-19 Somashekar D, Rati ER and Anand S, (2004). Isolation, numeration and PCR characterization of aflatoxigenic fungi from food and feed samples in India. Food Microbial 21:809-13.
20-Rodrigues P, Venâncio A, Kozakiewicz Z, et al., (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of Aspergillus Section Flavi isolated from Portuguese almonds. Int J Food Microbiol 129:187-93.
-21 Aziz NH, Shahin AAM, Abou-Zeid AAM, El-Zeany SA (2000). Correlation of growth and aflatoxin production by Aspergillusflavus with some essential metals in gamma irradiated crushedcorn.Nahrung44:354–359.http://dx.doi.org/10.1002/1521-380 (20001001)44:5<354: AID-FOOD354>3.0.CO;2-4.
22-Al-Othman MR, Abd El-Aziz ARM, Mahmoud MA, Fifan SA, El-Shikh, Majrashi M (2014). Application of silver nanoparticles as antifungal and antiaflatoxin B1 produced by Aspergillusflavus. Dig J Nanomater Bios 9: 151–157.
-23 Payne GA, Brown MP (1998). Genetics and Physiology of Aflatoxin Biosynthesis. Annu. Rev. Phytopathol. 36:329-62.

24-Yu,J.,Chang,P.K.,Ehrlish,K.C.,Cary,J.W., Bhatnagar,D.,Clevel,T.E.,Payne,G.A.,Linz,J.E., Woloshuk,C.P., and Bennett.J.W.(2004) . Clustered pathway and pathway genes. In: Guevara-Gonzalez R.G.Aflatoxins –Biochemistry and Molecular Biology, In Tec.Croatia. pp41-66.

-25 Price MS, Yu J, Nierman WC, Kim HS, Pritchard B, Jacobus CA, Bhatnagar D, Cleveland TE, Payne GA (2005). The aflatoxin pathway regulator aflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. FEMS Microbiol. Lett. 255: 275-279.

-26 Yu J, Ehrlich KC (2011). Aflatoxin Biosynthetic Pathway and Pathway Genes. In: Guevara- González R. G. Aflatoxins – Biochemistry and Molecular Biology. In Tec. Croatia. pp. 41-66.

27-Yu J (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. Toxins. 4:1024-1057.

28-Al -Jumaily SA (2014). Mycotoxin. Book house publisher. Iraq. pp.423.