التنميط الوراثي لبعض العزلات الفطرية اعتمادا على التغاير في منطقة ITS (internal transcribed spacer) كشفرة وراثية عالمية في تشخيص الفطريات

ماهر نعيم محمد
كلية الزراعة – جامعة القاسم الخضراء
agreemaher@yahoo.com

علاء حسن عيدان
كلية الزراعة – جامعة الكوفة
alaa_hasan@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة إلى تطبيق تقنية التشخيص الجزيئي اعتماد على التغاير في منطقة ITS region لتأكيد تشخيص بعض العزلات الفطرية ، فقد استخدمت الشفرة الجينية المعتمدة عالميا كمستوى تشخيصي جزيئي متقدم قياسا بالطرائق التشخيصية التقليدية المظهرية والمجهرية. وشملت الدراسة خمس عزلات فطرية حيث شخصت العزلات المنتخبة التابعة لأجناس *A.niger*.(2)، *A.flavus*.(1) ، *p.oxalicum*.(1)، *T.harzianum*.(1)، *Ulo. alternaria*.(1) التي تعود لصف الفطريات الناقصة ، وقد تم استخلاص ال DNA وتضخيم منطقة الهدف (ITS1 5.8S ITS2) في rDNA وباستخدام الزوج البادئ ITS1 – ITS4 الذي ضخم وبنجاح منطقة الهدف ولجميع العزلات المختبرة، وانعكس ذلك بظهور خمس حزم على الهلام بأوزان جزيئية مختلفة. أكدت نتائج تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل وجود تباين في الحزم ولجميع العزلات الفطرية المختلفة والتي تراوحت بين ٦٢٥ – ٤٩٦ زوجا قاعديا . فقد سجلت عزلات الجنس *T.harzianum*.(1) اكبر وزن جزيئي ٦٢٥ زوجا قاعديا ، وسجلت عزلة الجنس *A.niger*.(2) وزن جزيئي ٥٩٩ زوجا قاعديا في حين سجل *A.flavus*.(1) وزن جزيئي ٥٩٥ زوجا قاعديا . وقد سجلت عزلة الفطر *P.oxalicum*.(1) وزن جزيئي٥٧٥ زوجا قاعديا، في حين سجل الجنس *Ululocladium alternaria*.(1) اقل وزن جزيئي تراوح بين ٤٩٦ – ٤٩٨ زوجا قاعديا . وخلصت دراسة التنميط الوراثي إلى أن تقنيات التنميط نجحت في تشخيص العزلات بشكل مميز عند منطقة ال ITS حيث أظهرت خمس حزم مختلفة نتيجة لاختلاف الأنواع والأجناس للعزلات المختبرة، وقد توافقت واكدت نتائج هذه الدراسة التشخيص المجهري والمظهري لهذه العزلات . وتوصي الدراسة باعتماد هذه التقنية في الدراسات التصنيفية الجزيئية بعدها طريقة تشخيصية متقدمة وكذلك دقيقة وسريعة.

الكلمات المفتاحية : التنميط الوراثي – ITS – تشخيص الفطر يات

Abstract

This study aimed to use ITS (internal transcribed spacer) region as a universal DNA barcode in identifying some fungal strains to confirm molecular diagnosis . Five strains from deuteromycetes class have been selected.*Aspergillus niger* .(2), *Aspergillus flavus* .(1) , *Pencillum oxalicum*.(1), *Trighoderma harzianum*.(1) , *Ulocladium alternaria*.(1) DNA of the five strains have been extracted, and the target region (ITS1 5.8S ITS2) of the rDNA has been amplified by using the universal primers ITS1 – ITS4. The gel photo visualized five bands in different molecular size between 496-625 bp. The difference in bands size refer to the genetic diversity among the strains which were as following, *Trighoderma harzianum*.(1) 625 bp, *.Aspergillus niger* .(2) 599 bp, *Aspergillus flavus* .(1) 595 bp, *Pencillum oxalicum*.(1)575 bp,. *Ulocladium alternaria*.(1) 496-498 bp. The study has been successfully identify the five strains according to the genetics differences in ITS region which Compatible with microscopic and morphological identification, thus, this study recommended using a molecular studies which is more accurate and quick identification compare with the traditional one in fungai

Key word : ITS- internal transcribed spacer.

المقدمة

ان تحديد الأنماط الجينية (genotypes) للكائنات المستهدفة التي تحدد درجة التشابه أو الاختلاف الوراثي على مستويات تصنيفية وراثية مختلفة قد تكون بين أفراد النوع الواحد أو السلالات التابعة لنوع معين أو الأنواع والأجناس المختلفة ، باعتماد نواتج تفاعل البلمره الجزيئية Polymerase Chain Reaction

(PCR) هو ما يعرف بمفهوم التنميط الوراثي Genotyping (Hey 2001) . وفي الفطريات لطالما كان تشخيص وتصنيف الأنواع والسلالات الفطرية ذات الأهمية محط اهتمام العلماء ، فكان التفكير بإيجاد نظام تصنيفي متقدم أو شفرة عالمية مثل ال DNA barcoding التي تمثل طريقة تصنيفية سهلة وسريعة تستخدم معلمة جينية قصيرة short genetic marker ضمن جينوم الكائن الحي (Chu *et al*., 2006). وحاليا استخدمت في الدراسات التصنيفية الوراثية منطقة الـــ ITS التي هي عبارة عن تتابع من القواعد النيتروجينية المتواجدة على الـــ DNA الرايبوسومي (rDNA) للجين وهذه المنطقة لها دور مهم وحرج في تطوير وظيفة الحامض النووي الرايبوسومي rDNA (Iwen *et al* ., 2002). ان التباين في تسلسلات مناطق ال Intragenic transcriptional space (ITS) للفطريات المختلفة اعتمد في التشخيص كونها مناطق تصنيفية استرتيجية .

كان لاكتشاف الاختلافات والتغايرات الكبيرة في المناطق غير المشفرة ITS في DNA الفطريات أهمية كبيرة في اكتشاف طريقة دقيقة وسريعة لتشخيص الفطريات على مستوى الأنواع والسلالات وغيرها من المجاميع التصنيفية ، وكذلك ساعد في فهم ودراسة العلاقات التطورية Phylogenic relationships وكيفية نشوء الأنواع والسلالات الجديدة ، لقد تم التعرف على العديد من مناطق ال ITS في ال DNA التي عدت كشفرة عالمية Universal fungal barcode لتمييز الفطريات (Conrad *et al*., 2012).يعتمد تصميم وتتابع البوادئ العامة لهذه المنطقة على تسلسل مناطق rDNA وهي مناطق (18s , 5.8s , 28s) وتضخم قطعة محددة من الـــ DNA منطقة الارتباط باستخدام زوج من البوادئ ITS1, ITS4 أو ITS1, ITS2(Iwata *et al* ., 2006). ولأهمية استخدام تتابعات مناطق أل ITS لل rDNA فقد تم تصميم العديد من البوادئ العالمية ذات الكفاءة العالية على تضخيم طيف واسع من تسلسلات ال DNA لكم هائل من الفطريات التي تستخدم حاليا يوميا في العديد من المختبرات حول العالم. وفي حقيقية النواة يتألف جينوم الفطريات لكروموسوم أل rDNA من وحدات متكررة وتتكون الواحدة من الجينات (23s– 5.8s–16s) يفصلها اثنتين من المباعدات Intergenic Transcribed spacers(ITS2 ,ITS1) واثنتين من متواليات التبادل الخارجي (5 and 3 ETS) وتستنسخ هذه الوحدات من إنزيم RNA polymerase 1 وتفصل اوبرونات rDNA عن بعضها عن طريق مناطق غير مشفرة (IGS) وتتميز مناطق (ITS) في جينوم حقيقية النواة باختلافها اختلافا كبيرا في الحجم والتسلسل في التعاقب (Hausner and Wang , 2005) . هناك العديد من الدراسات اعتمدت منطقة أل ITS كشفرة DNA barcode في تشخيص العديد من الفطريات مثل أنواع الجنس *Trichoderma* الطور الجنسي *Hypocrea*(Druzhinina *et al*., 2005).وكذلك تصنيف مجموعة الفطريات التابعة لصف ال Zygomycetes (Schwarz *et al*.,2006) وأنواع فطر ال *Fusarium*، (Geiser *et al*., 2004) . وعزلات جنس الفطر *Penicillium* (Seifert *et al*., 2007) . حيث ان التغاير في هذه المنطقة يعد صفة تشخيصية خاصة كون أن لكل جنس ونوع فطري تسلسل خاص به ومتباين في الأجناس والأنواع المختلفة (Pyrce and Pallodino, 2003; Mancini *et al* ., 2005). وقد أجريت

دراسة تم فيها تطبيق تقنية أل PCR لتضخيم منطقة ال ITS لـــ ١٩ عزلة للفطر *Phytophthora citrophthora*من مواقع جغرافية مختلفة من اليابان وتم قياسها بعزلات أخرى من ال *citrophthora* فضلا عن الانواع الأخرى القريبة جينيا وتمت المطابقة بواسطة قاعدة البيانات لل DNA (Jamal Uddin *et al.*, 2007) . وقد كان لاكتشاف مناطق ال ITS أهمية في دراسة الأصول النسبية Lineages للأنواع المختلفة للعديد من الفطريات وفهم العلاقة التطورية لهذه الأنواع ، حيث تمت دراسة مقارنة لأكثر من ٥٠ نوع من فطريات ال *Phytophthora*كذلك تم قياس هذه الأنواع مع ال Oomycetes الأخرى باعتماد تسلسلات ال ITS لل rDNA لأكثر من ٢٣٤ عزلة لل *Phytophthora*(Cook *et al.*,2000). وفي دراسة أخرى قد اختبرت مناطق ال ITS في جينوم العديد من المجاميع الفطرية، فقد تم تمييز وتشخيص العديد من أنواع الجنس *Aspergillus* بدراسة ٤ مواقع جينية Locus في تسلسل ال DNA وقد أظهرت التغايرات الوراثية في ال ITS العلاقة التطورية للأنواع المختلفة لهذا الجنس (Geiser *et al.,* 2007). وقد ساعدت دراسة مناطق ال ITS في التمييز بين الأنواع المتقاربة تصنيفيا لنفس الجنس *Aspergillus* ، حيث سجلت أطوال هذه المنطقة في انواع *Asp.flavus* (٥٩٥ زوجا قاعديا) و *A.fumigatus* (596–598 زوجا قاعديا) و *A.terreus* (613 زوجا قاعديا) و *A. niger* (599 زوجا قاعديا) (Fujita *et al.*,2001) ، وكان لهذه المنطقة قيمة تشخيصية عالية لاسيما للعزلات ذات الأهمية الطبية Clinical Isolates، والذي ساهم في التشخيص المبكر للإصابات الفطرية (Travis *et al.*, 2000). كذلك ساهمت دراسة مناطق ال ITS للتمييز بين العديد من الأنواع للفطر*Fusarium* وتسلسلات من ال COX1Cytochrom oxidase للتمييز بين الأجناس للمايتوكوندريا لهذا الفطر *Fusarium* على فهم العلاقات التطورية Phylogenic relationships لسلالات هذا الجنس وكيفية نشوء السلالات الجديدة (Scott *et al.*, 2009). وقد درست التسلسلات الجينية للCOX1Cytochrom oxidase لحوالي ٥٨ نوعا للفطر *Penicillium* وتم تقييم كفاءة هذه الشفرة الجينية وقياسها بمناطق ال ITS للتعرف على المجاميع التصنيفية المختلفة للفطر *Penicillium* واعتمادها للتشخيص الدقيق بين هذه المجاميع (Keith *et al.*, 2007). كذلك بينت الدراسة التي اعتمدت PCR–RFLP كطريقة سريعة ودقيقة في تشخيص ٦٠ عزلة للفطر *Penicillium* ، حيث اظهرت نتائج البلمرة لمناطق ال ITS التي تم تضخيمها باستخدام البوادئ العالمية القدرة على التمييز بين السلالات والعزلات القريبة وراثيا من بعضها، وقد برهنت هذه الشفرة الجينية مدى كفاءتها في التمييز بين الأنواع المختلفة للفطر *Penicillium* (Dupont *et al.* 2006). وفي دراسة أجريت في بولندا تضمنت تقييم للتنوع الجغرافي للجنس *Trichoderma* والتي شملت أكثر من ١٧٠ عزلة عزلت من أكثر من ٥٠ موقعا ، وقد أظهر نتائج تضخيم لمناطق ال ITS باستخدام الزوج البادئ ITS2 – ITS1 كفاءة استخدام هذه الشفرة الجينية في التمييز والتشخيص الدقيق للأنواع المختلفة للفطر *Trichoderma* (Blaszczyk *et al.*, 2011). ولأهمية الفطريات البيضية *Oomycetes* ولا سيما الجنسين *Pythium* , *Phytophthora* كممرضات نباتية وما تسببه من خسائر سنويا في المحاصيل ،فان التشخيص الدقيق و السريع على مستوى الأنواع مهم جدا في حالات تفشي هذه الممرضات. إن استخدام ال DNA barcoding مع ال cytochrome c oxidase I (COI)كان احد الطرائق المعتمدة للتشخيص على مستوى الأجناس لمجموعة فطريات Oomycetes. وعليه فقد تم إيجاد تسلسلات ال COI من ١٢٠٥ عزلة ممثلة ل ٢٣ جنس وبواسطة قياس مناطق ال ITS كطريقة حديثة للتشخيص مع تسلسلات ال COIفكانت كلا التسلسلات كفؤة كشفرة وراثية تشخيصية معتمدة

عالميا .وساعدت دراسة ال ITS في DNA العديد من العزلات الفطرية لهذين الجنسين على السهولة والدقة في التعرف عليها وسرعة التشخيص لتحديد نوع الإصابة والسيطرة عليها (Greggp *et al.*, 2011). وقد أجريت العديد من الدراسات لتقييم مدى أهمية استخدام الشفرات الجينية ال DNA bar-coding ومدى التقدم الحاصل في مجال تشخيص الفطريات على اثر استخدامها قياسا بالطرق التقليدية ، وفي مراجعة شاملة ضمت مسح عام للمجاميع الفطرية المختلفة حيث ذكر بان أكثر من ٧٠٠٠٠ تسلسل لمناطق ال ITSامعتمد في قاعدة بيانات بنك الجينات أو قواعد بيانات أخرى متخصصة بالفطريات . وقد تضمنت الدراسة تحديد لحجم نتائج التضخيم لمناطق ال ITS بالنسبة لمجموعة الفطريات الناقصة المختلفة والتي تضم فطريات , *Trichderma* , *Penicillium,Aspergillus* (Keith, 2009) .وفي العراق اجريت العديد من الدراسات التي اعتمدت استخدام الطرائق الوراثية الجزيئية للتشخيص (الطائي ٢٠٠٧ ، الجعفري ٢٠١١، الطائي واخرون ٢٠١٠) ، ففي دراسة اجريت لتشخيص والتوصيف الجزيئي للفطر المسبب لمرض الذبول الفيوزارمي في الخيار بينت نتائج تقنية (ITS) Internal Transcribed Spacers ظهور الحزمة المتوقعة للجين 550 (زوجا قاعديا) من جميع عزلات الفطر .*Fusarium* spp حيث تمكنت هذه التقنية من الكشف وبدقة عن نوع الفطر . *F. oxysporum* تم الكشف وبدقة عن الفطر *F. o.* f.sp *cucumerinum* باستعمال تقنية التضخيم المزدوج Nested-PCR و باستعمال بادئات متخصصة إذ بلغ حجم الجين 211 زوجا قاعديا و هذا يؤكد صحة التشخيص المظهري (المبارك، ٢٠١٣). وأظهرت نواتج التنميط الوراثي باستخدام البادئ المتخصص لخميرة *C.glabrata* من تشخيص جميع عزلات خمائر المبيضات، وقد خلصت دراسة التنميط الوراثي الى ان تقنيات التنميط الوراثي شخصت عزلات النوع الواحد عن بقية الانواع من جهة وتميزت تقنيات التنميط الوراثي لمنطقة ITS باستخدام البوادئ ITS4-ITS3 ITS2-ITS1وITS4-ITS1 التي ساهمت بشكل مميز في وضع بعض ألأنواع في أنماط واضحة في حين أظهرت تقنية التنميط الوراثي العشوائيRAPD- PCR في وضع العزلات المتقاربة في أنماط ذات تماثل كبير عبر عنه بالشجرة التطورية .(الشكري، ٢٠١٣).

وقد هدفت دراسة البحث تنفيذ تشخيص جزيئي لتأكيد تشخيص بعض العزلات الفطرية التي ابدت كفاءة تحطيمية ضد متبقيات بعض مبيدات الادغال التي تم انتخابها في دراسة سابقة كمستوى تشخيصي وراثي متقدم بالقياس الى الطرائق التشخيصية التقليدية المظهرية والمجهرية. وذلك بتطبيق تقنية ITS كشيفرة تشخيصية معتمدة دوليا وباستخدام بوادئ عالمية ITS Universal primer تحديدا بوادئ (ITS1-ITS4) بعد استخلاص DNA الحامض النووي للعزلات المدروسة وتضخيم منطقة الهدف (ITS1 5.8S ITS2) باستخدام تقنية البلمرة PCR .

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة في مختبرات التقنيات الإحيائية التابعة لكلية العلوم للبنات /جامعة بابل وذلك بإشراف الدكتور زيدان خليف المعموري.

- **حصاد الغزل الفطري للعزلات المنتخبة :**

انتخبت خمس عزلات فطرية تابعة لأجناس وانواع مختلفة وتقع جميعها ضمن صف الفطريات الناقصة وهي :

A.niger(2)

A.flavus(1)

P.oxalicum(1)

T.harzianum(1)

Ulocladium. alternaria(1)

تم حصاد كمية من الكتلة الحيوية (٠.٥ – ١)غرام وزن طري تقريبا للعزلات وذلك بعد تنشيطها على وسط PDA و بعمر سبعة أيام باستخدام أطباق بتري دش قطر ٩سم تم إضافة ٢مل من المحلول الدارئ الفسيولوجي لكل طبق وفي ظروف معقمة والمحضر بإذابة 8.5 غم من كلوريد الصوديوم في 100 مل من الماء المقطر ، وجرى تعقيمه بالمؤصدة بدرجة حرارة 121 سيليزية وبضغط 15 باوند / إنج^2 ولمدة 15 دقيقة . ومزجت جيدا مع الكتلة الحيوية للغزول الفطرية وابواغها و تم سحب مزيج الكتلة الحيوية لكل عزلة باستخدام شفرة معقمة مع مراعاة عدم اخذ أي كمية من الاكار إلى أنابيب ابندروف Eppendroff tubes وبواقع ثلاثة مكررات لكل عزلة وحفظت في المجمدة بدرجة (-٢٠) م لحين الاستعمال

-تشخيص عزلات القدرة التحطيمية باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة Polymerase Chain Reaction : (PCR)

اولا: استخلاص وتنقية الـــ DNA:

استعملت عدة استخلاص وتنقية الـــ DNA والمجهزة من شركة Promega الأمريكية وحفظت محاليل عدة الاستخلاص والتنقية بدرجة حرارة– 20م لحين الاستخلاص.

استخدمت طريقة العمل الخاصة بطقم الاستخلاص المجهز من شركة Promega وعلى النحو الآتي–: بعد تعديلها بإضافة الأنزيم Protinase K وفقا لما ذكره Mirhendi وجماعته (2005) و Sambrook (2001) اتبعت الخطوات الآتية :

١– أخذت العزلات المحفوظة في المجمدة والمحضرة سابقا (حصاد الغزل الفطري)

٢– أضيف (293) مايكروليتر من محلول EDTA إلى كل انبوبة من أنابيب ابندروف الحاوية على العزلات

٣– استخدمت الماصة الدقيقة لتكسير الخلية الفطرية من خلال تكرار السحب والدفع حتى لا تبقى الكتلة الحيوية المأخوذة طافية على السطح أو تترسب إلى أسفل الأنبوبة .

٤– أضيف (7.5) مايكروليتر من (20) ملغم / مل من أنزيم البروتينيز لكل أنبوبة من الأنابيب المذكورة سابقا .

٥– مزجت الأنابيب جيدا بواسطة الماذج الكهربائي Vortex أربع مرات .

٦– حضنت الأنابيب جميعها بدرجة حرارة (56) م لمدة (60) دقيقة لكي يقوم أنزيم البروتينيز بعملة على تكسير الأغشية وجدران الخلايا .

٧– نبذت الأنابيب مركزيا لمدة (2) دقيقة وبسرعة (1200) دورة بالدقيقة ثم أزيل الرائق المتكون بواسطة ماصة دقيقة مع مراعاة تغيير خرطوم Tip الماصة الدقيقة عند كل استعمال .

٨– أضيف (800) مايكروليتر من محلول Nuclei lysis إلى تلك الأنابيب ومزجت جيدا بواسطة الماذج الكهربائي Vortex .

٩– أضيف(1.5) مايكروليتر من محلول Rnase Solution وذلك لتنقية ال DNA من حامض RNA ومزجت الأنابيب جيدا بواسطة الماذج الكهربائي Vortex لعدة ثواني وحضنت جميع الأنابيب بدرجة حرارة (37) م لمدة (15) دقيقة .لتنشيط فعالية تحطيم RNA.

١٠- أضيف بعد ذلك (100) مايكروليتر من محلول Protein Precipitation ومزجت أيضا بشكل جيد بواسطة الماذج الكهربائي

١١- وضعت الأنابيب جميعها على الثلج لمدة (5) دقيقة ثم نبذت مركزيا لمدة (3) دقائق وبسرعة (12000) دورة بالدقيقة

١٢- نقل الرائق Suspernatant الحاوي على الـــ DNA بواسطة ماصة دقيقة الى أنابيب ابندروف جديدة حاوية على (300) مايكروليتر من الايزوبروبانول Isopropanol المخزون بدرجة حرارة الغرفة وذلك لغرض ترسيب الـــ DNA .

١٣- مزجت الأنابيب برفق لملاحظة كتلة الـــ pellet of DNA .

١٤- بعد ذلك نبذت مركزيا لمدة (12) دقيقة وبسرعة (12000) دورة بالدقيقة

١٥- استخدمت الماصة الدقيقة لإزالة الرائق من كل أنبوبة ، أضيف (500) مايكروليتر من ٧٠ % ايثانول إلى كل أنبوبة ثم مزجت جيدا لتجميع الـــ DNA .

١٦- نبذت المحتويات (12000) دورة لمدة (2) دقائق بدرجة حرارة الغرفة بعدها تم التخلص من الكحول من الأنابيب باستخدام الماصة

١٧- ثم جففت تلك الأنابيب بوضعها بشكل مقلوب على ورق ناشف لمدة (30) دقيقة لكي يتبخر الايثانول من جميع الأنابيب .

١٨- أضيف (50) مايكروليتر من محلول DNA Rehydration لإذابة الـــ DNA

١٩- حضنت الأنابيب بدرجة (70) م لمدة ساعة واحدة وذلك لكي يعمل DNA Rehydration لإذابة كتلة الـــ DNAالمترسبة في قاع الأنابيب .

٢٠- حفظت النماذج في درجة حرارة – 20م لحين إجراء عملية التضخيم .

ثانيا: تفاعل البلمرة المتسلسل المفرد (PCR) Polymerase Single Chain Reaction:

- المحاليل والمواد المستخدمة في تقنية الـــ PCR المجهزة من الشركات التالية:

١- محلول الـــ T.E.buffer مجهز من شركة Promega الأمريكية(Madison,WI,USA)

٢- البادئ العام Universal primers (ITS1- ITS4)المبين تسلسله في الجدول (١) وذلك لتنميط العزلات الفطرية المنتخبة لمنطقة ITS

٣- Master Mix المجهز من شركة Promega الأمريكية .

وقد تم حفظ المحاليل والمواد بدرجة حرارة – ٢٠م لحين الأستعمال .

جدول (١) تتابع القواعد النتروجينية للبادئ العام ITS1- ITS4

طول البادئ (قاعدة)	تتابع القواعد النيتروجينية	اسم البادئ ونوعه
19 bp	5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′	primer ITS1
20 bp	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′	primer ITS4

- طريقة عمل وتحضير تفاعل الـــ (PCR) :

استخدمت هذه التقنية لتضخيم منطقة ITS في الـــ DNA التي تعمل عليها الأزواج البادئة – ITS4 ITS1 بالاعتماد على طريقة(1998)Mannarelli and kurtzman .من خلال إضافة المحتويات جدول (٢) واعتمادا على النشرة المرفقة لـــ (Master mix)

جدول (٢) أحجام المواد الكيميائية المجهزة لتفاعل PCR

المادة الكيميائية		الحجم
Master Mixture22,5 µL	PCR master mix solution	12.50 µL
	Forward primer	0.25 µL
	Reverse primer	0.25 l µL
	Nuclease- free Water	9.5 l µL
	DNA	1.5 µL
	Total	24 µL

بعد إتمام الإضافات جميعها مزجت العينات مركزيا بواسطة الطرد المركزي الخاص بأنابيب الـــ PCR ونقلت العينات بعد ذلك إلى جهاز الدورة الحراري Thermalcycler PCR ثم جرى تفاعل البلمرة بتشغيل الجهاز وبرمجته وحسب البروتوكول التالي:

١- الخطوة الاولى : مرحلة المسخ Initial Denaturation تتضمن دورة واحدة بدرجة حرارة 95 م لمدة ثلاث دقائق

٢- الخطوة الثانية: الالتئام تتضمن ثلاث درجات حرارية وتتكرر هذه الخطوة ثلاثين دورة بثلاث مراحل :

- المرحلة الأولى تسمى مرحلة المسخ Denaturation تمت بدرجة حرارة 94 م مدة ١٠ ثواني
- المرحلة الثانية تسمى الالتئام Annealing Temperature وهي مرحلة ارتباط البادئ بقالب الـــ DNA تمت بدرجة حرارة 57 م لمدة ١ دقيقة
- المرحلة الثالثة تسمى مرحلة الاستطالة Extension تمت بدرجة حرارة 72م لمدة ١ دقيقة

٣- الخطوة الثالثة تسمى الاستطالة النهائية Final Extension تتضمن دورة واحدة بدرجة حرارة 72م لمدة خمس دقائق.

٤- الخطوة الرابعة تسمى خطوة التبريد Cool step تم بدرجة حرارة 4م .

ثالثا: الترحيل الكهربائي لنواتج البلمرة

١- المحاليل والمواد المستخدمة في عملية الترحيل الكهربائي:

- محلول التحميل 6 x DNA Loading Dye مجهز من Promega.
- محلول صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide استخدمت صبغة بروميد الاثيديوم مجهزه من شركة BDH-chem-Ltdboo 0.5ul .
- محلول الـــ T.B.E buffer مجهز من شركة Promega.

- الآكاروز Agarose استعمل الآكاروز المعقم من شركة Norgen Biotechnology .
- 1ooo bp DNA Ladder مجهز من شركة Promega الأمريكية

طريقة إجراء الترحيل الكهربائي

تم إجراء الترحيل الكهربائي Electrophoresis باستعمال هلام الاكاروز ووفقا لما ذكره Iwata وجماعتة (2006) و Hattoriوجماعته (2006) حيث استخدمت طريقة الترحيل الكهربائي للكشف عن نواتج الـــ PCR .وتم وضع هلام الاكاروز على شاشة وحدة الاشعة البنفسجية U.V. Transllimnater لملاحظة حزم الـــ .... DNA ، ثم تصوير النتائج بالكاميرا الرقمية على جهاز وحدة الاشعة البنفسجية . U.V. Transllimnater

النتائج والمناقشة

شخصت العزلات المنتخبة التابعة لأجناس مختلفة التي أبدت كفاءة تحطيمية عالية *A.niger.(2)* ، *A.flavus.(1)* ، *P.oxalicum.(1)* ، *T.harzianum.(1)* ، *Ulocladium alternaria.(1)* وقد صنفت العزلات بالطرائق التقليدية على وسط بطاطا دكستروز أجار (PDA) وتم دعم وتأكيد تشخيص جزيئي لهذه العزلات للاستفادة من الطرائق التشخيصية الحديثة في الدراسات الزراعية وذلك بتضخيم مواقع تشخيصية محددة في جينوم الفطريات حيث تم اعتماد البوادئ العالمية لتضخيم منطقة الهدف (5′− TCCTCCGCTTATTGATATGC−3′ و ITS1 Primer (TCCGTAGGTGAACCTGCGG−3′ ITS4 Primer 5′− في منطقة ITS region كمؤشر تصنيفي وراثي معتمد لدراسة التباينات الوراثية ما بين العزلات الفطرية المختلفة في هذه المنطقة وقد تميزت نتائج استخدام هذه البوادئ بالنجاح والدقة العالية في التشخيص الجزيئي لأنواع الفطريات المنتخبة وذلك كون منطقة الهدف الأكثر طولا مقارنة بالبوادئ الأخرى لهذه المنطقة (Sambrook *et al.*,1989) ; الطائي ،٢٠٠٧) . وقد أظهرت نتائج التضخيم لمنطقة الهدف للزوج البادئ ITS1 – ITS4 عند تحليل ناتج الهجرة الكهربائية باستعمال الاجاروز بتركيز ٢% شكل () ظهور حزم بإحجام جزيئية مختلفة وتظهر هذه النتيجة نجاح الزوج البادي في تضخيم منطقة الهدف (ITS1 5.8S ITS2) لكر وموسوم rDNA الرايبوسومي وانعكس ذلك بظهور حزم بأوزان جزيئية مختلفة في حجم وعدد ونوعية القواعد النيتروجينية لانترونات واكسونات منطقة الهدف وذلك للتباين الوراثي ما بين العزلات الفطرية التابعة لأجناس وراثية مختلفة جدول (٣).

جدول (٣) الحجم الجزيئي لمنطقة (ITS1 5.8S ITS2) باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR)

فقد أكدت نتائج تضخيم تفاعل البلمرة المتسلسل شكل (١) وجود تباين في حزم الوزن الجزيئي عند تضخيم منطقة الهدف ولجميع العزلات الفطرية المنتخبة تراوحت بين ٦٢٥ – ٤٩٦ زوجا قاعديا .

شكل (١) التنميط الجزيئي لمنطقة ITS region باستخدام الزوج البادئ ITS1 – ITS4

التسلسل	العزلات الفطرية	الحجم الجزيئي (bp)
١	*A.niger(2)*	٥٩٩
٢	*A.flavus(1)*	٥٩٥
٣	*P.oxalicum(1)*	٥٧٥
٤	*T.harzianum(1)*	٦٢٥
٥	*Ulo. alternaria(1)*	٤٩٨ – ٤٩٦

Ulocl = ***Ulocladium***، **Pen** = ***P.oxalicum***، **Asp.fv** = ***A.flavus***، **Trichod** = ***T.harzianum***

Asp.ng = ***A.niger2*** ، **M** = المعلمة الجزيئية (100bp)

فقد سجلت عزلات الجنس *T.harizianum.(1)* اكبر وزن جزيئي ٦٢٥ زوج قاعدي، وهذا ما اتفقت معه الدراسة التي أجريت في بولندا تضمنت تقييم للتنوع الجغرافي للجنس *Trichoderma* التي شملت أكثر من ١٧٠ عزلة ، حيث اظهر تضخيم مناطق أل ITS نتائج بلمرة تتراوح بين ٥٨٠-٦٣٥ زوجا قاعديا لمعظم العزلات (Blaszczyk *et al.* 2011). وقد سجلت عزلة الجنس *A.niger.(2)* وزن جزيئي ٥٩٩ زوجا قاعديا في حين سجل *A.flavus.(1)* وزن جزيئي ٥٩٥ زوجا قاعديا . وتتفق نتائج التضخيم لعزلات هذين الفطرين مع ما توصل اليه (Travis *et al.*,(2000حيث أظهرت الدراسة عند تضخيم منطقة(ITS1 5.8S ITS2) لبعض عزلات الفطر *Aspergillus* إن نواتج البلمرة كانت تتراوح ما بين ٥٦٥-٦١٣ زوج قاعدي ،وان نتائج هذه الدراسة ساهمت في التمييز بين الأنواع المتقاربة تصنيفيا للجنس نفسة *Aspergillus* ، الذي كان لها قيمة تشخيصية عالية لا سيما للعزلات ذات الأهمية الطبية Clinical Isolates، الذي ساهم في التشخيص المبكر لهذه الإصابات الفطرية. وقد اتفقت نتائج التضخيم ايضا مع ما توصل اليه Fujita *et al.*,(2001) حيث اظهرت دراسة منطقة الهدف ITS للجنس *Aspergillus* تباين متقارب ما بين الانواع وقد سجل النوع *A.flavus* (٥٩٥ زوجا قاعديا) و *A.fumigatus* (596-598 زوجا قاعديا) و *A.terreus* (613 زوجا قاعديا) و *A. niger* (599 زوجا قاعديا). وقد سجل الفطر *P.oxalicum.(1)* وزن جزيئي٥٧٥ زوجا قاعديا وقد اتفقت نتائج تضخيم عزلة الفطر *P.oxalicum.* مع ما توصل إليه Keith *et al.*, (2007) فعند تقييم كفاءة التسلسلات الجينية لل COX1Cytochrom oxidaseلحوالي ٥٨ عزلة للفطر *Penicillium* وقياسها بالشفرة الجينية لمناطق ال ITS فأن البوادئ قد ضخمت ٥٤٥ - ٥٩٠ زوجا قاعديا للعديد من العزلات ، وقد ساعدت هذه الدراسة في التعرف على المجاميع التصنيفية المختلفة للفطر *Penicillium* واعتمادها للتشخيص الدقيق بين هذه المجاميع. وقد جاءت نتائج التضخيم متقاربة مع نتائج التضخيم في دراسات أخرى باستخدام الزوج البادئ ITS4 – ITS1 في تضخيم منطقة (ITS1 5.8S ITS2) التي تعطي نتائج بلمرة تتراوح بين (٤٥٠- ٨٧٠) زوجا قاعديا . هي ضمن الأحجام المتوقعة لهذه الأنواع (Conrad *et al.*2012). كذلك اتفقت هذه النتائج مع ما توصل إليه Keith, (2009) في مراجعة شاملة ضمت مسح عام للمجاميع الفطرية المختلفة حيث كانت نتائج التضخيم لمناطق ال ITS متباينة بين مجاميع الفطريات وكانت تتراوح ما بين ٤١٢-٨١٠ زوجا قاعديا. وكذلك أشار Mirhendi *et al.*,(2006) إلى أن مناطق ال ITS region تظهر تباين بين المجاميع الفطرية المختلفة حبث تم تضخيم منطقة (ITS1 5.8S ITS2) باستخدام الزوج البادئ ITS4 – ITS1 والتي أعطت حزما تتراوح بين ٤٠٠-٨٠٠ زوجا قاعديا. كذلك اتفقت النتائج مع الدراسة التي اعتمدت PCR-RFLP كطريقة سريعة ودقيقة في تشخيص ٦٠ عزلة للفطر *Penicillium* ، وقد أظهرت نتائج البلمرة لمناطق ال ITSالتي توصل إليها Dupont *et al.*, (2006) حيث ضخمت البوادئ حوالي ٦٢٠ زوجا قاعديا لجميع العزلات، وقد برهنت هذه الشفرة الجينية مدى كفاءتها في التمييز بين الأنواع المختلفة للفطر *Penicillium.* في حين سجل الجنس *Ulocladium alternaria.(1)* اقل وزن جزيئي تراوح بين ٤٩٦ - ٤٩٨ زوجا قاعديا . ويعود السبب في تباين إحجام الحزم لوجود اختلافات وراثية في حجم وطول منطقة الهدف التشخيصية التي تكون ثابتة ضمن النوع الواحد في هذه المنطقة ومختلفة بين الأنواع الفطرية والعزلات وقد جاءت نتائج التنميط الوراثي للعزلات متوافقة مع احجام الحزم للدراسات المشابهة مما يؤكد ويدعم صحة التشخيص المظهري والمجهري لهذه العزلات .

اتقدم بالشكر الجزيل والتقدير للدكتور الفاضل الاستاذ زيدان خليف المعموري لتوجيهاته العلمية وابداء المساعدة المستمرة لتنفيذ وانجاز هذا البحث في مختبر التقنيات الاحيائية كلية العلوم للبنات /جامعة بابل .

المصادر

الجعفري، ايمان صباح عبد الامير. ٢٠١١. التشخيص المظهري والجزيئي لانواع الفطر *Fusarium* المرافقة لجذور الطماطة باستخدام التفاعل السلسلي للبوليمريز Polymerase Chain Reaction. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة البصرة .١١٨ صفحة.

الشكري، هديل ناصر. ٢٠١٣. التنميط الجيني لعزلات المبيضات المهبلية بالبلمرة البسيطة والعشوائية وتقييد نواتج البلمرة في محافظة بابل. رسالة ماجستير–كلية العلوم –جامعة بابل.

الطائي، هدى حازم وافي. ٢٠٠٧. التشخيص الجزيئي للفطر *Verticillum dahliae* المسبب للذبول الفرتيسليومي على الزيتون وطرائق مقاومته.اطروحة دكتوراه –كلية الزراعة– جامعة الموصل.١٩٢ صفحة.

الطائي، وركاء قاسم ونديم احمد رمضان ورياض خليل الهادي (٢٠١٠). دراسة التشابه بين الأنواع المختلفة من جنس *Alternaria* باستخدام مؤشرات التضاعف العشوائي للحامض النووي ألريبي منقوص الأوكسجين. مجلة وقاية النبات العربية.٢٨:١٢٧–١٣٣.

المبارك، زهراء حيدر عبد الكريم .٢٠١٣. التوصيف الجزيئي للفطر *Fusarium oxysporum f.sp cucumerinum* المسبب لمرض الذبول الفيوزارمي في الخيار بتقنيات التفاعل السلسلي للبوليمريز Polymerase Chain Reaction وامكانية مكافحته المتكاملة. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة البصرة .١٠٣ صفحة.

Błaszczyk L ; Delfina Popiel ; Jerzy Chełkowski ; Grzegorz Koczyk ; Gary J. Samuels ; Krzysztof Sobieralski and Marek Siwulski. (2011). Species diversity *of Trichoderma* in Poland. J Appl Genetics . 52:233–243.

Chu KH, Li CP, Qi J (2006). Ribosomal RNA as molecular barcodes: a simple correlation analysis without sequence alignment. Bioinformatics 22:1690-1701.

Conrad L. S., Keith A. S., Sabine H., Vincent R., John L. S., C. André L.,Wen C.(2012).Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. PNAS . 109 (16): 6241–6246.

Cook, D.E.L., Drenth, A., Duncan, J.M., Wagels, G., Brasier, C.M.(2000). A molecular phylogeny of phytophthora and related *Oomycetes*. Fungal genetics and biology. 30:17-32.

Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komon M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma*and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology 42:813 -828.

Dupont J, Bruno Dennetiere, Claire Jacquet and Marie-France Roquebert. (2006). PCR-RFLP of ITS rDNA for the rapid identification of *Penicillium subgenus Biverticillium* species. Rev Iberoatn Micol; 23: 145-150.

Fujita, S. I., Senda, Y., Nakaguchi, S. and Hashimoto, T.(2001). Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains *J.* Clin. Microbiol. 39(10):3617.

Geiser DM, Jimenez-Gasco MD, Kang SC, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O"Donnell K (2004). FU.S.A.RIUM-ID v. 1.0: A

DNA sequence database for identifying *Fusarium*. European Journal of Plant Pathology 110:473 -479.

GREGG P. R., ARTHUR W. A. M. D.,MICHAEL D. C.,HERMANN V.,HENK B., KANAKB and DAVID W. C.(2011). DNAbarcoding of *oomycetes* with cytochrome c oxidas subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources . 11:1002–1011.

Geiser D.M., Klich M.A., Frisvad J.C., Peterson S.W., Varga J., Samson R.A.(2007).The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Studies in Mycology .59:1–10.

Hausner, G. and Wang, X. (2005). Genome., 48: 648 .

Hattori, H.; Iwata, T.; Nakagawa, Y.; Kawamoto, F.; Tomita, Y.; Kikuchi, A.; *et al*.,(2006). Genotype analysis of *Candida albicans* isolates obtained from different body locations of patients with superficial candidiasis using PCRs targeting 25S rDNA and ALT repeat sequences of the RPS. J Dermatol Sci., 42: 31-46.

Hey J (2001). Genes, Categories and Species*:* The Evolutionary and Cognitive Causes of the Species Problem. Oxford: Oxford University Press.

Iwen, P.C.; Hinrichs , S.H.; Rupp, M.E.(2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect andidentify human fungal pathogens. Med mycol., 40:87-109.

Iwata, T.; Hattori, H.; Chibana, H.; Mikami, Y.; Tomita, Y.; Kikuchi, A. *et al*.,(2006). Genotyping of *Candida albicans* on the basis of polymorphisms of ALT repeats in the repetitive sequence (RPS) J Dermatol Sci., 41: 43-54.

Jamal uddin, A.F.M, M.senda;suematsu and Kageyama (2007). phylogenetic relationship of *phytophthora citrophthora* isolates based on rDNA in internal transcribed spacer sequenge analysis . international journal of integrative Biology.

KEITH A. SEIFERT . (2009).Progress towards DNA barcoding of fungi. Molecular Ecology Resources .9 :83–89.

Keith A. S., Robert A. S., Jeremy R. d., Jos H., C. Andre, Jean-Marc M.,Gerry L., and Paul D. N. H. .(2007).Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. PNAS . 104(10): 3901–3906.

Mancini, N.; Ossi, C. M.; *et al*. (2005). Direct sequencing of *Scedosporium apiospermum* DNA in the Diagnosis of a case of keratitis. J.Med. Microbiol., 54 (ptg): 897–900.

Mirhendi, H.; Makimura, L.; Zomorodian, K.; Maeda, N.; Ohshima, T.; Yamaguchi, H.(2005). Differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* using a single-enzyme PCR-RFLP method. Jpn J Infect Dis.,58:235-237.

Mirhendi, H.; Makimura, K.; Khoramizadeh, M.; Yamaguchi, H.(2006). A one-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida species*. Jpn J. Med .Mycol.,47:225-229.

Pyrce, T. M. and Pallodino, S. (2003). Rapidientify of fungi byscreeningthe ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary.electrophorsis system. Med. Mycology., 41(5) : 396 -381.

Schwarz P, Bretagne S, Gantier JC, Garcia-Hermoso D, Lortholary O, Dromer F, Dannaoui E (2006). Molecular identification *of Zygomycetes* from culture and experimentally infected tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 44:340-349.

Seifert KA, Samson RA, Dewaard JR, Houbraken J, Levesque CA, Moncalvo JM, Louis-Seize G, Hebert PD (2007). Prospects for fungus identification using

CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. Proceedings of the National Academy of Sciences *U.S.A.* 104:3901 -3906.

SCOTT R. G., TOM G., GERRY L and KEITH A. S.(2009). Multiple copies of cytochrome oxidase 1 in species of the fungal genus *Fusarium*. Molecular Ecology Resources 9 (1): 90–98.

Sambrook, J. and Russell, D.W.(2001). Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed. Cold spring Harbor laboratory press . New York. USA .

Sambrook, J., E.F.Fritsch and T.Maniatis(1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Travis H., Peter C. I., Steven H. H.(2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. J. of clinical my**crobiology. 38(4): 1510–1515.**