

## تقدير التعبير الجيني لبعض الجينات المسؤولة عن إنتاج السموم وإفرازها في فطر الرشاشيات الدخلاء *Aspergillus fumigatus* المتطفلة على بذور الحنطة المخزونة في صوامع محافظة صلاح الدين، تكريت

أيه فاضل نوري ، أ.م.د. رافع زيدان مخلف السكمانى  
جامعة تكريت/كلية العلوم /قسم علوم الحياة

Corresponding author E mail: aya.f.noori.bio449@st.tu.edu.iq

### مستخلص:

يُعد فطر الرشاشيات الدخلاء *Aspergillus fumigates* من الفطريات المخزنية الشائعة التي تُهاجم بذور الحنطة وتنتج سمومًا فطرية خطيرة مثل الجليوتوكسين، مما يشكل تهديدًا مباشرًا على جودة الحبوب وسلامة المستهلك. هدفت هذه الدراسة إلى عزل وتشخيص هذا الفطر من عينات حنطة مخزونة محليًا، وتقييم تأثير المعالجة بالميكروويف على مستوى التعبير الجيني لجيني *gila* و *gilz*، المسؤولين عن تنظيم وإنتاج الجليوتوكسين. تم جمع عشرين عينة من صوامع الخزن في مدينة تكريت بمحافظة صلاح الدين، وزُرعت العينات على وسط PDA بعد تعقيمها. جُمعت عزلات نقية من الفطر وشُخصت مظهرًا ومجهريًا باستخدام الصفات الشكلية والمفاتيح التصنيفية المعتمدة. تعرضت المستعمرات الفطرية للمعالجة بالموجات المايكروويفية لفترات زمنية تراوحت بين 10 و 60 ثانية، تلاها استخلاص RNA وتحويله إلى الحمض النووي التكميلي cDNA، ثم تحليل التعبير الجيني باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي (RT-qPCR). أظهرت النتائج أن التعبير الجيني لكل من الجينين *gila* و *gilz* اتبع نمطًا زمنيًا مميزًا، حيث ارتفع تدريجيًا مع ازدياد زمن المعالجة ليبلغ ذروته عند 40 ثانية، ثم انخفض بشكل ملحوظ عند 50 و 60 ثانية. سجل الجين *gilz* أعلى قيمة Folding بلغت 157.99، في حين سجل الجين *gila* قيمة قياسية وصلت إلى 240.79. تشير هذه النتائج إلى أن التعريض الحراري بالميكروويف قد يُحفز مؤقتًا استجابة فسيولوجية في الفطر تُنشط المسارات الجينية المرتبطة بإنتاج السموم، قبل أن تؤدي الفترات الأطول إلى تثبيط تلك المسارات. تُبرز هذه الدراسة إمكانية استخدام المعالجة بالميكروويف كوسيلة فعالة للحد من نشاط الفطريات المخزنية السامة، مما يُسهم في تحسين سلامة تخزين الحبوب.

الكلمات المفتاحية: الرشاشيات الدخلاء، جليوتوكسين، جينات *gila* و *gilz*، مايكروويف، rt-qPCR، الحنطة.

### Assessment of Gene Expression of Some Genes Responsible for Toxin Production and Secretion in *Aspergillus fumigates*, Parasitizing on Wheat Seeds in Silos in Salah al-Din Governorate, Tikrit

#### Abstract :

*Aspergillus fumigates* is a common storage fungus that invades wheat seeds and produces hazardous mycotoxins such as gliotoxin, posing a direct threat to grain quality and consumer safety. This study aimed to isolate and identify this fungus from locally stored wheat samples, and to evaluate the effect of microwave treatment on gene expression levels of the *gilz* and *gila* genes, responsible for regulating and producing gliotoxins. Twenty samples were collected from storage silos in Tikrit, Salah al-Din Governorate, and cultured on sterilized PDA medium. Pure isolates of the fungus were collected and characterized morphologically and microscopically using morphological characters and validated taxonomic keys. Fungal colonies were microwaved for 10–60 seconds, followed by RNA extraction and conversion to cDNA, and gene expression analysis using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The results showed that gene expression of both *gilz* and *gila* followed a distinct temporal pattern, gradually increasing with treatment time, peaking at 40 seconds and then declining significantly at 50 and 60 seconds. The *gilz* gene recorded the highest Folding value of 157.99, while the *gila* gene recorded a record value of 240.79. These results suggest that microwave exposure may temporarily induce a physiological response in fungi that activates gene pathways involved in toxin production, before longer periods of exposure lead to inhibition of these pathways. This study highlights the potential of microwave treatment as an effective means of reducing the activity of toxic storage fungi, thereby contributing to improved grain storage safety.

**Keywords:** *Aspergillus fumigates*, gliotoxin, *gilz* and *gila* genes, microwave, rt-qPCR, wheat.

### المقدمة

الحبوب وانتشار السموم [3][4]. على سبيل المثال، تؤدي الرطوبة المرتفعة إلى زيادة احتمالية تكوين الأبواغ الفطرية التي تساهم في انتشار الفطر داخل الصوامع، كما تتيح تراكم السموم الفطرية الخطيرة مثل الأفلاتوكسينات والجليوتوكسين، والتي تُعرف بتأثيراتها السامة والمسرطنة [5]. من بين الفطريات الخيطية الأكثر شيوعاً في تلوث الحبوب هو فطر رشاشيات الدخناء *A. fumigatus*، ينتمي جنس الرشاشيات *Aspergillus* إلى مجموعة واسعة من الأنواع التي تمتلك قدرة عالية على مقاومة الظروف البيئية الصعبة وإنتاج السموم. ومن أشهر هذه الأنواع هو الرشاشيات الدخناء *Aspergillus fumigatus* الذي يزدهر في البيئات الرطبة والدافئة، ويُفرز السم الفطري الجليوتوكسين [6]. يلعب الجليوتوكسين دوراً مهماً في تعزيز قدرة الفطر على مقاومة الجهاز المناعي للكائن المضيف، مما يسمح له بالبقاء والانتشار داخل الحبوب المخزنة، ويتم إنتاج هذا السم عبر نظام جيني منظم يضم جينات مثل *glia* و *gliz* التي تنظم إنتاج وإفراز السموم [6]. وبهدف تقليل الضرر الناتج عن هذه الفطريات والسموم، تم تطوير تقنيات معالجة مبتكرة، من بينها المعالجة بالموجات المايكروويفية، التي أثبتت قدرتها على تقليل نمو الفطريات وإتلاف الأبواغ، مع الحفاظ على جودة الحبوب الغذائية [7]. هدفت الدراسة الحالية إلى عزل وتشخيص هذا الفطر من عينات حنطة مخزونة محلياً، وتقييم تأثير المعالجة بالمايكروويف على مستوى التعبير الجيني لجيني *gliz* و *gila*، المسؤولين عن تنظيم وإنتاج الجليوتوكسين.

تُعدّ الحنطة *Triticum aestivum* L من أهم المحاصيل الاستراتيجية التي يعتمد عليها الإنسان في تأمين احتياجاته الغذائية، وذلك لأحتوائها على مكونات غذائية متكاملة تشمل النشويات، البروتينات، والألياف، بالإضافة إلى الفيتامينات والمعادن. تحتل الحنطة مكانة متقدمة ضمن السلع الزراعية الأساسية على المستوى العالمي، وتُشكل غذاءً رئيسياً للمليارات السكان، خاصة في بلدان الشرق الأوسط والعراق، حيث تشكل المكوّن الرئيس في الأنظمة الغذائية اليومية [1]. ورغم أهميتها الاقتصادية والغذائية، تواجه الحنطة بعد الحصاد مجموعة من التحديات التي تهدد جودة حبوبها وسلامتها أثناء التخزين، حيث تتعرض لإصابات متعددة من كائنات حية دقيقة، مثل الحشرات والبكتيريا والفطريات. وتُعتبر الفطريات من أبرز الملوّثات الحيوية التي تؤثر على حبوب الحنطة خلال مراحل التخزين، لما تمتلكه من قدرة على التكاثر في ظروف بيئية مختلفة، وإنتاج سموم فطرية ضارة بصحة الإنسان والحيوان [2]. مما يبرز الحاجة إلى دراسة خصائص هذه الفطريات والعوامل البيئية التي تسهم في انتشارها، مع تطوير استراتيجيات فعالة للحد من آثارها السلبية. إن نمو الفطريات وتطورها على الحبوب لا يحدث بمعزل عن الظروف البيئية المحيطة، إذ تلعب العوامل مثل درجة الحرارة والرطوبة دوراً حاسماً في تحديد مدى نجاح هذه الفطريات في التكاثر وإنتاج السموم. فدرجات الحرارة المرتفعة والرطوبة العالية داخل مخازن الحبوب (صوامع) توفر بيئة مثالية لنمو الفطريات وتكاثرها، مما يزيد من خطر تلف

المعاملة الحرارية بالميكروويف لفطر الرشاشيات الدخناء *fumigatus. A*: هدفت هذه التجربة إلى دراسة تأثير إشعاع الموجات المايكروية على مستوى التعبير الجيني للجينات المسؤولة عن إنتاج السموم الفطرية في *fumigatus. A*. وُضعت المستعمرات الفطرية في جهاز مايكروويف منزلي يعمل بقدرة 1000 واط، وتم تعريضها لأزمنة إشعاع مختلفة بلغت: 10، 20، 30، 40، 50، و60 ثانية. تكررت المعاملات ضمن ثلاث مجموعات تضمنت: مكرراً واحداً، خمسة مكررات، وعشرة مكررات. عقب كل معالجة، أستخلص الحمض النووي الرايبوزي (RNA) من العينات، تمهيداً لتحليل التعبير الجيني باستخدام تقنية RT-qPCR.

استخلاص RNA : لتحليل التعبير الجيني باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل الكمي اللحظي (RT-qPCR)، استُخدمت عدة استخلاص RNA الجاهزة (Transzol Up Plus) من شركة TRANS. تم سحق الكتلة الفطرية المجمدة باستخدام التروجين السائل داخل هاون خزفي حتى تحولت إلى مسحوق ناعم. وُضعت العينات في أنابيب إيبندورف (Eppendorf) سعة 2 مل، ثم خضعت لعملية الاستخلاص التي تضمنت استخدام محلول Transzol Up، ثم إضافة الكلوروفورم، تلاها الطرد المركزي للحصول على الطور المائي الشفاف. بعد ذلك، ترسيب الحمض النووي الرايبوزومي RNA باستخدام الإيثانول المطلق (96% ≤). نُقلت العينات إلى أعمدة ترشيح ثم غُسلت بمحلولي Washing 1 و Washing 2. بعد الانتهاء من مرحلة الغسل، جُففت الأعمدة بواسطة الطرد المركزي، ثم أُعيد استخلاص RNA بإضافة محلول Elution buf- الخالي من RNase. حُفظت العينات المستخلصة

## طرق العمل

جمع العينات : تم جمع عينة من بذور الحنطة خلال شهر تشرين الثاني (نوفمبر) من عام 2024، من صوامع خزن في مدينة تكريت بمحافظة صلاح الدين. شملت العينات صنفين محليين: «بخضم» و«بدون خضم». نُقلت العينات إلى مختبر الفطريات في قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت، لتقييم التلوث الفطري تحت ظروف التخزين المحلية.

عزل الفطريات وزراعتها : تم تعقيم بذور الحنطة بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 1% لمدة دقيقة واحدة، ثم شُطفت ثلاث مرات بالماء المعقم. زُرعت البذور على وسط غذائي من نوع Potato Dextrose Agar (PDA)، وأُضيف إليه مضاد حيوي (تتراسيكلين، 100 ملغم/ لتر) لمنع التلوث البكتيري. احتضنت الأطباق في حاضنة بدرجة حرارة  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  لمدة 5-7 أيام. تم الحصول على مستعمرات فطرية نقية من جنس الرشاشيات *Aspergillus*، وعُزل منها *fumigatus. A* ونُقلت إلى أوساط جديدة لاستكمال التشخيص المظهري والمجهري.

التشخيص المظهري والمجهري : سُخِّصت العزلات الفطرية مظهرياً من خلال الصفات الشكلية مثل اللون والملمس. أُعدت شرائح مجهرية باستخدام صبغة اللاكتوفينول القطني الأزرق لفحص التراكيب المجهرية، مثل الحوامل الكونيدية والكونيديا. جرى التشخيص بالاعتماد على المفاتيح التصنيفية المعتمدة. وقد استُخدمت المفاتيح التصنيفية المعتمدة في تصنيف الفطريات وفقاً لما ورد في [8].

البادئات المستخدمة واعداد تفاعل (RT-qPCR):  
صُممت بادئات خاصة للكشف عن التعبير الجيني لجيني *gilz* و *gila* في حين استُخدم الجين المرجعي هذه البادئات من شركة MacroGene (كوريا). حُضرت البادئات بتركيز نهائي 10 بيكومول/ميكروليتر، وذلك من خلال إذابة 10 ميكروليتر من محلول الـ stock solution في 90 ميكروليتر من ماء خالٍ من RNase-Free. جدول (1) تسلسل ازواج البادئات.

في ظروف مجمدة مناسبة حتى تحويلها إلى الحمض النووي التكميلي cDNA.  
تحويل RNA إلى cDNA: تم إجراء تحويل RNA إلى cDNA باستخدام عدة Easy Script First Strand cDNA synthesis من شركة TRANS. شملت المكونات: 7 ميكروليتر من RNA، و1 ميكروليتر من ES Reaction Mix، و10 ميكروليتر من Reaction Mix، و1 ميكروليتر من Anchored Oligo، و1 ميكروليتر من إنزيم EasyScript RT/RI Enzyme Mix.

البادئ	التسلسل
<i>gilZ</i>	'ACGACGATGAGGAATCGAAC-3-5'
<i>gilZ</i>	'TCCAGAAAAGGGAGTCGTTG -3-5'
<i>gila</i>	'TTT GCG ATC AAC GAA CTC TG-3-5'
<i>gila</i>	'CCC TTG ACG GAC TGG AAG TA-3-5'
<i>b-tublin</i>	'CTAGGCCAACGGTGACAAAT-3-5'
<i>b-tublin</i>	'GTTGTTACCAGCACC GGACT-3-5'

في التعبير الجيني، عبر مقارنة قيم Ct للجينات المستهدفة مع الجين المرجعي، بالإضافة إلى مقارنة مستويات التعبير الجيني بين العينات المعاملة والعينة الضابطة.

### النتائج والمناقشة

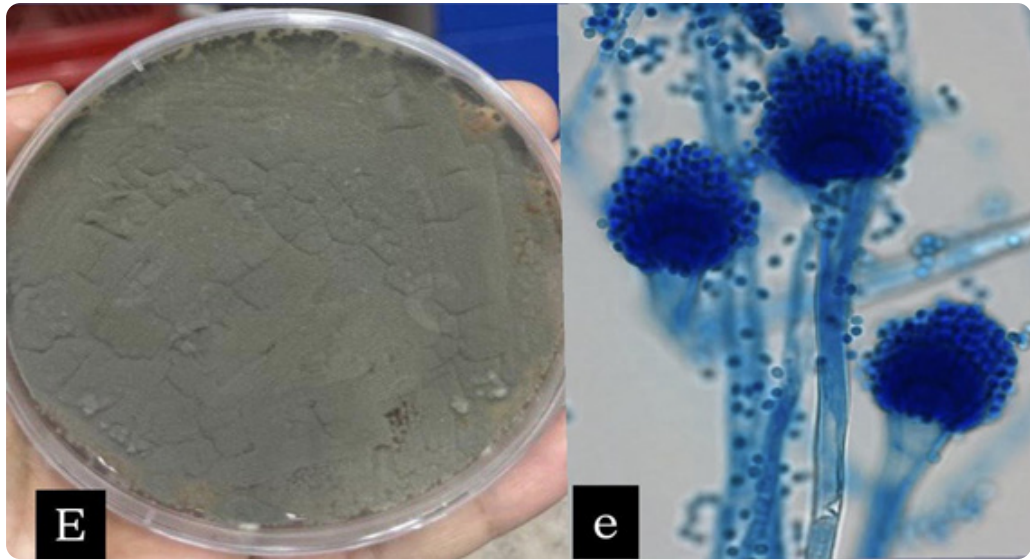
زراعة العينات: تمكنت الدراسة من الحصول على عزلات نقية من فطر *fumigatus. A*، والتي أظهرت نمواً جيداً عند زراعتها على وسط PDA، بعد فترة حضانة تراوحت بين 5 إلى 7 أيام عند درجة حرارة 25°م.

التشخيص المظهري والمجهري: عند فحص العزلات فحصاً مظهرياً ومجهرياً، تبين أنها تنتمي إلى جنس *Aspergillus*، المصنف ضمن مملكة

اعداد تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي -RT-qP-  
CR: أُجري التفاعل النهائي بحجم 20 ميكروليتر باستخدام مكونات التفاعل (10 ميكروليتر من خليط Perfect Start Green qPCR Super Mix الجاهز، 1 ميكروليتر من cDNA، 0.5 ميكروليتر من كل من البادئ الأمامي والعكسي، 8 ميكروليترات من ماء RNase-Free). تم خلط المكونات برفق وتوزيعها في أنابيب PCR، وأُجري التفاعل في جهاز RT-qPCR وفق البرنامج الحراري (المسخ الابتدائي عند 94°C لمدة 3 دقائق، 40 دورة تتضمن: المسخ عند 94°C لمدة 15 ثانية، الارتباط عند 60°C لمدة 45 ثانية، الاستطالة عند 72°C لمدة دقيقة واحدة).  
تحليل البيانات: تم تحليل نتائج RT-qPCR باستخدام طريقة  $\Delta\Delta Ct$  لحساب التغير النسبي

المدروسة صفات مظهرية مميزة شملت ملمساً مخملياً للمستعمرات، وتكون الكونيديا كروية ذات مظهر مخملي ومنظمة على شكل سلاسل، وهي صفات تصنيفية بارزة لهذا النوع. ورغم تطور الحاصل في تقنيات التشخيص الجزيئي، لا تزال الصفات الشكلية تُعد عنصراً أساسياً في تشخيص الفطريات، لاسيما في المختبرات التي تفتقر إلى تقنيات التحليل الجزيئي [9].

الفطريات *Fungi*، تحت مملكة *Dikarya*، والشعبة *Ascomycota*، وتحت الشعبة *Pezizomycotina*، والطائفة *Ascomycetes*، تحت طائفة *Eurotiomy-* *Trichocoma-*، ورتبة *Eurotiales*، وفصيلة *Trichocoma-* *ceae*. تميزت عزلة *fumigatus. A* ذات لون رمادي إلى أخضر مزرق، مع وجود كونيديا كروية تُرتب على شكل سلاسل، كما هو موضح في الشكل (1). وقد أظهرت العزلات



الشكل (1): الشكل المظهري E والشكل المجهرى e لفطر *fumigatus. A* بعد تنميته على وسط PDA

الفطر لأجهاد المايكرووييف، يُحفّز سلسلة من الاستجابات الخلوية تشمل تنشيط جينات تنظيمية ودفاعية، من ضمنها الجينات المرتبطة بإنتاج السموم. وفي هذا السياق، تم تحليل مستوى التعبير الجيني للجينين المدروسين بعد تعريض المستعمرات الفطرية لأزمنة معالجة مختلفة (10، 20، 30، 40، 50، 60 ثانية)، باستخدام تقنية RT-qPCR، وقورنت النتائج بالعينة الضابطة غير المعالجة. تم حساب التغير النسبي في التعبير الجيني (Folding) باستخدام معادلة  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، وذلك لتحديد مدى التغير في التعبير الجيني لكل معاملة نسبةً إلى العينة

دراسة التعبير الجيني باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي RT-qPCR: هدفت الدراسة إلى تقييم دقيق لمستوى التعبير الجيني لجيني *gilz* و *gila* في فطر *fumigatus. A* عند تعريضه لإجهاد حراري ناتج عن المعالجة بالموجات المايكروويفية. يُعد الجين *gilz* عامل نسخ رئيسي ينشط الجينات الأخرى في العنقود الجيني المسؤول عن إنتاج السم الفطري الجليوتوكسين، في المقابل يُسهم الجين *gila* في تصدير السم خارج الخلية من خلال ناقل من نوع Major Facilitator Superfamily (MFS)، ما يُساعد الفطر في تجنب السمية الذاتية. عند تعرض

وُثق ارتفاع معتدل في التعبير عند 20 ثانية في العينتين T20-R1 و T20-R5، في حين انخفض في T20-R10. أما عند 30 ثانية، فقد لوحظ ارتفاع ملحوظ في مستويات التعبير، حيث سجلت العينة T30-R1 أعلى قيمة ضمن هذه المجموعة. بلغ التعبير الجيني ذروته عند 40 ثانية، إذ سجلت العينة T40-R1 قيمة Folding بلغت 157.99، بينما تراوحت القيم في المكررات الأخرى (R5 و R10) بين 59.91 و 78.31. عقب هذه الذروة، انخفض مستوى التعبير الجيني بشكل حاد عند 50 و 60 ثانية، حيث سجلت العينة T60-R10 أدنى قيمة تعبير بلغت 0.07.

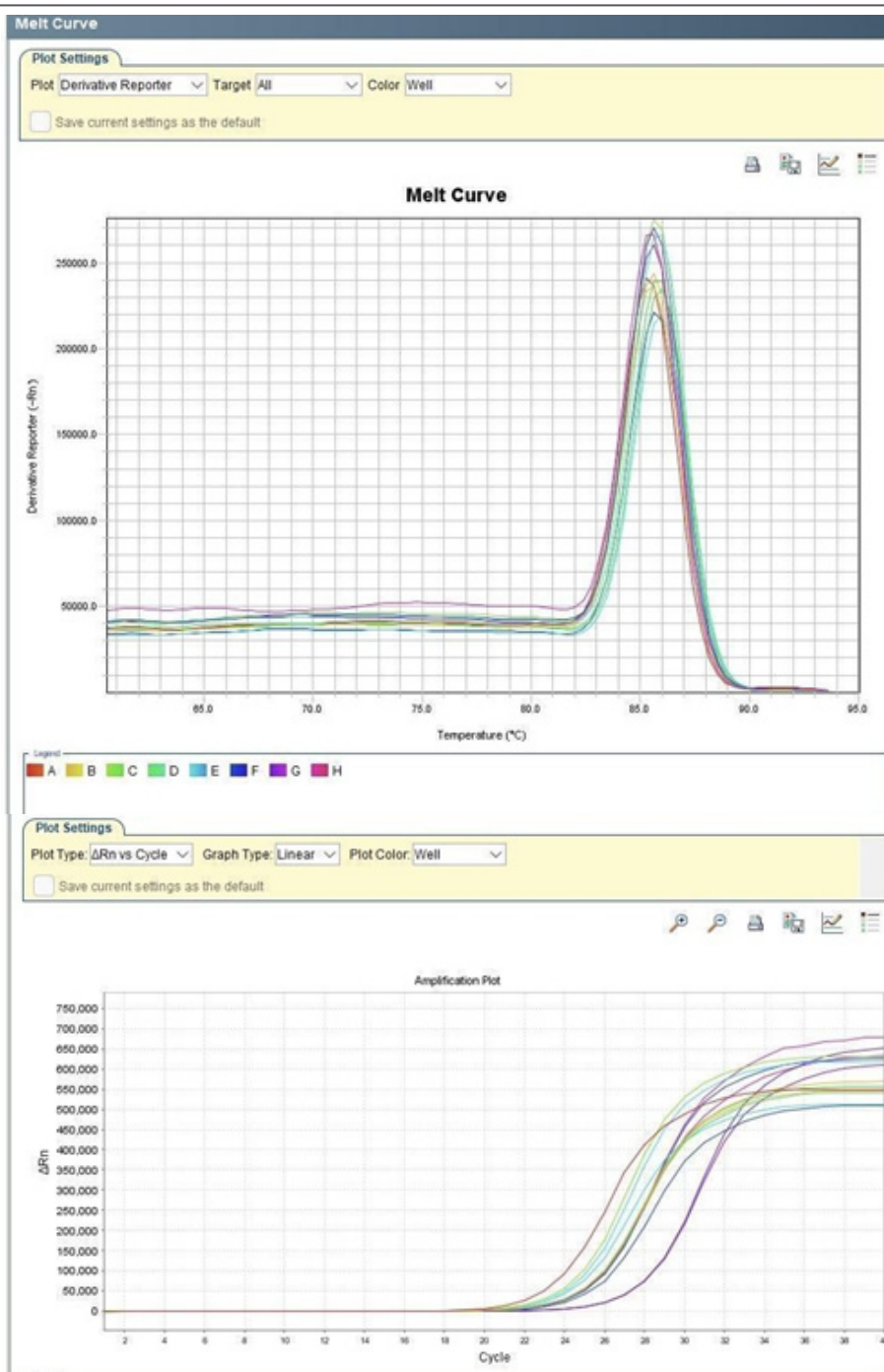
المرجعية. قيم التعبير الجيني لجين *gilz*: أظهرت نتائج تحليل RT-qPCR أن الجين *gilz* عبّر عن نفسه في جميع العينات، بما في ذلك عينات السيطرة غير المعالجة. تم احتساب قيم  $\Delta Ct$  لكل عينة بطرح قيمة Ct للجين المرجعي من قيمة Ct للجين المستهدف، ثم حُسبت قيم  $\Delta\Delta Ct$  بمقارنتها مع متوسط  $\Delta Ct$  لعينات السيطرة، مما أتاح اشتقاق قيم (Folding) باستخدام معادلة  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . عند زمن تعريض قدره 10 ثوانٍ، أظهرت العينات T10-R1 و T10-R5 و T10-R10 مستويات تعبير منخفضة نسبيًا، تراوحت بين 1.12 و 1.65.

جدول (2) قيم Folding لجين *gilz* لفطر *A. fumigatus*

Seq	Sample ID	Target	Hous	$\Delta Ct$ Pat	$\Delta Ct$ Control mean	$\Delta\Delta Ct$	Folding
1	عينة السيطرة	24.228	22.736	—	1.716	0.000	1.000
2	عينة السيطرة	24.756	22.703	—	1.716	0.000	1.000
3	عينة السيطرة	24.562	22.959	—	1.716	0.000	1.000
4	T10-R1	23.296	24.076	-0.780	1.716	-2.496	5.62
5	T10-R5	25.138	27.686	-2.548	1.716	-4.264	19.43
6	T10-R10	24.25	22.834	1.416	1.716	-0.300	1.23
7	T20-R1	25.141	24.289	0.852	1.716	-0.864	1.82
8	T20-R5	24.45	25.27	-0.82	1.716	-2.536	5.81
9	T20-R10	25.394	23.354	2.04	1.716	0.324	0.80
10	T30-R1	27.957	23.645	4.312	1.716	2.596	0.16
11	T30-R5	25.487	26.508	-1.021	1.716	-2.737	6.65
12	T30-R10	23.889	24.049	-0.16	1.716	-1.876	3.67
13	T40-R1	23.387	28.971	-5.584	1.716	-7.3	157.99
14	T40-R5	25.091	27.917	-2.826	1.716	-4.542	23.56
15	T40-R10	24.527	28.241	-3.714	1.716	-5.43	43.48
16	T50-R1	25.467	25.897	-0.43	1.716	-2.146	4.37
17	T50-R5	27.763	23.968	3.795	1.716	2.079	0.23
18	T50-R10	25.347	24.51	0.837	1.716	-0.879	1.83
19	T60-R1	27.536	24.944	2.592	1.716	0.876	0.55
20	T60-R5	28.507	22.946	5.561	1.716	3.845	0.07
21	T60-R10	28.728	23.969	4.759	1.716	3.043	0.12

التعريض والتعبير الجيني حتى الوصول إلى الحد الأقصى، يعقبها علاقة عكسية نتيجة الإجهاد الحراري المفرط الذي قد يفوق قدرة الفطر على التكيف الفسيولوجي.

تشير هذه النتائج إلى أن التعبير الجيني للجين *gilZ* يتبع نمطاً زمنياً مميزاً؛ يبدأ بمستوى منخفض، ثم يرتفع تدريجياً ليبلغ ذروته عند زمن تعريض 40 ثانية، يليه تراجع حاد مع زيادة مدة التعريض. ويُبرز هذا السلوك وجود علاقة طردية بين زمن



الشكل (2) تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي *rt-qPCR* لجين *gilZ*

نتيجة تنظيم اليات التنظيم الذاتي السالبة التي تلعب دوراً في كبح إنتاج المفرط للسموم، وهو ما اشار اليه [14] في سياق تنظيم الثانوي للفطريات. ويُلاحظ أيضاً وجود تباين في مستويات التعبير بين المكررات عند الزمن ذاته، مثل العينات T40-R1 و T40-R10، وهو ما قد يُعزى إلى اختلافات في الكتلة الحيوية أو في المرحلة الفسيولوجية للعزلة الفطرية، أو إلى تأثير التكرار في المعالجة، الذي قد يُحدث استجابة تراكمية أو متفاوتة تبعاً للحالة الأيضية للخلية. بناءً على ما تقدم، تؤكد نتائج هذه الدراسة أن جين *gilz* يُعد من أهم المؤشرات الجزيئية على استجابة فطر الرشاشيات الدخناء *Aspergillus fumigatus* للمعالجة المايكروبية، إذ يعكس تعبيره نمطاً زمنياً يتناسب طردياً مع شدة الإجهاد حتى زمن معين، يعقبه تراجع بسبب تجاوز القدرة التكيفية للفطر. قيم التعبير الجيني لجين: *gila* أظهرت نتائج تحليل RT-qPCR أن الجين *gila* عبّر عن نفسه في جميع العينات المدروسة، بما في ذلك عينات السيطرة غير المعالجة. وكما في تحليل *gilz*، تم احتساب قيم  $\Delta Ct$  من خلال طرح Ct الجين المرجعي من Ct الجين المستهدف، تلتها حسابات  $\Delta\Delta Ct$  مقارنةً بالمتوسط الحسابي لعينات السيطرة، مما أتاح اشتقاق قيم Folding التي تعكس التغير النسبي في التعبير الجيني.

عند زمن تعريض قدره 10 ثوانٍ، أظهرت العينات تبايناً ملحوظاً؛ إذ سجّلت T10-R1 قيمة منخفضة بلغت 0.257، بينما سجّلت T10-R5 تعبيراً مرتفعاً (19.715)، في حين كانت قيمة T10-R10 معتدلة (1.532). هذا التباين استمر عند 20 ثانية، حيث اقتربت T20-R1 من مستوى السيطرة (0.960)، بينما انخفضت T20-R5

تُظهر نتائج التعبير الجيني لجين *gilz* استجابة فسيولوجية واضحة من فطر الرشاشيات الدخناء *Aspergillus fumigatus* عند تعريضه للإجهاد الحراري الناتج عن الموجات المايكروويفية. تمثلت في ارتفاع تدريجي في مستوى التعبير الجيني لجين *gilz* بلغ ذروته عند زمن تعريض 40 ثانية، ثم انخفض بشكل ملحوظ مع زيادة زمن المعالجة. يُعد هذا الجين عامل نسخ تنظيمي من نوع  $Zn_2$ -Cys<sub>6</sub>، ويشكل عنصراً محورياً ضمن العنقود الجيني المسؤول عن إنتاج السم الفطري الجليوتوكسين، حيث يعمل على تحفيز التعبير عن بقية الجينات المشاركة في التخليق الحيوي للسم، وفقاً لما أورده [10].

توافق الذروة المسجلة في زمن التعريض 40 ثانية بلغت 157.99 مع ما اشارك اليه [11]، الذين بينوا ان الجين *gilz* يتفاعل بشكل ملحوظ عند التعرض للإجهادات البيئية مثل الحرارة أو الإجهاد التأكسدي، من خلال تفعيل المسارات الثانوية المرتبطة بإنتاج السموم. يُفسر هذا النمط التصاعدي في التعبير بأنه ناتج عن تنشيط مسارات التأشير الخلوي، مثل cAMP-PKA أو MAPK، والتي تحفز بدورها الجينات التنظيمية استجابة للإجهاد. أظهرت دراسات اخرى [12][13]، أن تعطيل جين *gilz* يؤدي الى توقف تام في إنتاج الجليوتوكسين، مما يؤكد اهميته الحيوية في استجابة الفطر للضغوط البيئية، ودوره في بقاء الفطر وتكيفه. أما الانخفاض الحاد في التعبير الجيني بعد زمن 40 ثانية، فقد يُعزى إلى تجاوز الفطر لعتبة التحمل الفسيولوجي، مما يؤدي إلى تثبيط في نشاط الجينات التنظيمية أو إلى حدوث تلف خلوي ناتج عن فرط التعرض للحرارة. كما يُحتمل أن يكون هذا التراجع

جميع المعاملات، بما في ذلك عينات السيطرة غير المعالجة، مع تباين ملحوظ في مستويات التعبير تبعاً لمدة التعريض للموجات المايكروويفية. يُعد *gila* من الجينات التنظيمية الأساسية في العنقود الجيني المسؤول عن إنتاج الجليوتوكسين، حيث يُسهم في تصدير السم خارج الخلية عبر ناقل من نوع Ma-jor Facilitator Superfamily، مما يُساعد الفطر في تجنب التأثيرات السمية الناتجة عن تراكم السم داخل الخلايا.

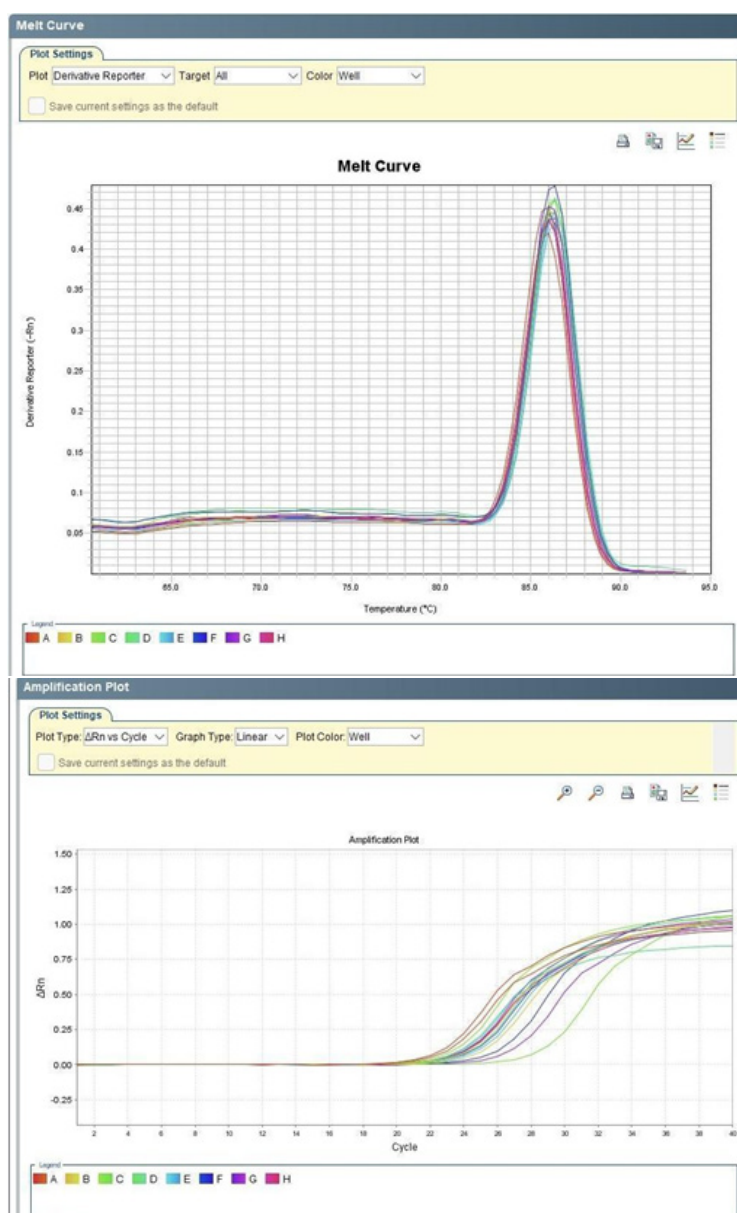
سجّلت أعلى قيمة للتعبير الجيني عند زمن تعريض 40 ثانية، إذ بلغت قيمة *Folding* في العينة T40-R1 نحو 240.79، وهو ما يمثل ذروة استجابة الفطر للجهد الحراري. تتوافق هذه النتيجة مع ما ورد في دراسة [14]، التي أكدت أن الجين *gila* يُفعل بشكل كبير عند التعرض لظروف بيئية ضاغطة، خاصة تلك المرتبطة بالإجهاد التأكسدي أو الحراري، باعتباره جزءاً من آلية الدفاع الخلوية ضد السموم.

إلى 0.170، وسجلت T20-R10 ارتفاعاً نسبياً (1.294). وعند 30 ثانية، لوحظ تفاوت في التعبير تراوح بين انخفاض واضح في T30-R1 (0.190) وارتفاع ملحوظ في T30-R5 (2.395)، فيما سجلت T30-R10 تعبيراً متوسطاً (1.686). بلغت ذروة التعبير عند 40 ثانية، حيث سجلت T40-R1 أعلى قيمة *Folding* بلغت 240.792، كما أظهرت العينتان T40-R5 و T40-R10 مستويات مرتفعة (45.325 و 84.262 على التوالي). عقب الذروة، بدأ التعبير الجيني بالتراجع عند 50 ثانية، وسُجلت أدنى القيم عند 60 ثانية، حيث بلغت 0.120 في T60-R10. تُظهر هذه النتائج أن جين *gila* يتبع نمطاً زمنياً مشابهاً لجين *gilz*، إذ يرتفع التعبير تدريجياً مع زيادة مدة التعريض حتى الوصول إلى الذروة عند 40 ثانية، ثم يتناقص تدريجياً نتيجة تجاوز الفطر للحد الأقصى من قدرته التكيفية تحت الإجهاد. أظهرت نتائج تحليل التعبير الجيني باستخدام تقنية RT-qPCR أن الجين *gila* عبّر عن نفسه في

جدول (3) قيم *Folding* لجين *gila* لفطر *A. fumigatus*

Seq	Sample ID	Target	Hous	ΔCt Pat	ΔCt Control mean	ΔΔCt	Folding
1	عينة السيطرة	23.715	22.736	—	0.920	0.000	1.000
2	عينة السيطرة	23.663	22.703	—	0.920	0.000	1.000
3	عينة السيطرة	23.78	22.959	—	0.920	0.000	1.000
4	T10-R1	26.948	24.076	2.872	0.920	1.952	0.257
5	T10-R5	24.311	27.686	-3.375	0.920	-4.259	19.715
6	T10-R10	23.138	22.834	0.304	0.920	-0.616	1.532
7	T20-R1	25.267	24.289	0.978	0.920	0.058	0.960
8	T20-R5	28.728	25.270	3.459	0.920	2.538	0.170
9	T20-R10	23.901	23.354	0.547	0.920	-0.373	1.294
10	T30-R1	26.956	23.645	3.311	0.920	2.391	0.190
11	T30-R5	26.169	26.508	-0.339	0.290	-1.259	2.395
12	T30-R10	24.213	24.049	0.164	0.290	-0.756	1.686
13	T40-R1	21.997	28.971	-6.974	0.290	-7.894	240.792

Seq	Sample ID	Target	Hous	$\Delta Ct$ Pat	$\Delta Ct$ Control mean	$\Delta\Delta Ct$	Folding
14	T40-R5	23.333	27.917	-4.584	0.290	-5.504	45.325
15	T40-R10	22.750	28.241	-5.491	0.920	-6.411	84.262
16	T50-R1	23.991	25.897	-1.906	0.920	-2.826	7.031
17	T50-R5	23.463	23.968	-0.505	0.920	-1.425	2.684
18	T50-R10	24.015	24.510	-0.495	0.920	-1.415	2.662
19	T60-R1	25.631	24.944	0.687	0.920	-0.233	1.176
20	T60-R5	23.609	22.946	0.663	0.920	-0.257	1.196
21	T60-R10	22.602	23.969	-1.367	0.920	-2.287	4.891



الشكل (3) تفاعل البلمرة المتسلسل اللحظي rt-qPCR لجين *gila*

أهمية *gila* كهدف جزئي في الدراسات المعنية بالحد من إنتاج السموم الفطرية في الحبوب المخزونة.

### الاستنتاجات

أظهرت نتائج الدراسة أن فطر الرشاشيات *fumigatus Aspergillus* المعزول من بذور الحنطة المخزونة يمتلك قدرة واضحة على تنظيم إنتاج الجليوتوكسين عبر تنشيط الجينات المسؤولة عن التخليق *gilz* والتصدير *gila*، حيث استجاب كلا الجينين بوضوح لمعالجة الفطر بالموجات المايكروويفية، بنمط تعبيري زمني بلغ ذروته عند 40 ثانية من التعريض، تبعه انخفاض ملحوظ عند الفترات الأطول. تشير هذه النتائج إلى أن المعالجة الحرارية المتوسطة تُحفز مؤقتاً المسارات الجينية المرتبطة بإنتاج السموم كآلية دفاع فسيولوجية، إلا أن التعريض المطول يتسبب في كبح تلك المسارات بفعل الإجهاد الحراري المفرط. كما بينت الدراسة كفاءة التشخيص المظهري في عزل وتحديد الفطر، وهو ما يدعم إمكانية استخدام تقنيات بسيطة وفعالة للكشف الأولي عن الفطريات السامة في بيئات التخزين. ومن جهة أخرى، فإن التباين الملحوظ في التعبير الجيني بين المكررات يشير إلى ضرورة مراعاة تأثير عدد التكرارات والحالة الأيضية للعزلات عند تصميم التجارب الجزيئية وتفسير نتائجها. بصورة عامة، تؤكد هذه النتائج إمكانية الاستفادة من المعالجة المايكروويفية كوسيلة طبيعية وآمنة للحد من نشاط الفطريات المخزنية السامة، دون التأثير المباشر على جودة الحبوب، مع الحاجة إلى إجراء دراسات إضافية لتحديد الظروف المثلى التي تضمن تنشيط إنتاج السموم دون تحفيزها مؤقتاً.

يشير هذا الارتفاع الكبير في التعبير الجيني عند مدة تعريض معينة إلى وجود نقطة تحفيز قصوى تُفعل فيها الخلية الفطرية آليات تصدير السموم بشكل مكثف لتفادي التأثيرات السامة الداخلية. كما تدعم هذه الاستجابة الفرضية القائلة بأن معالجة الفطر بالموجات المايكروويفية تحفز تنشيط مسارات استشعار الإجهاد، مثل مسارات  $Ca^{2+}$ -calmodulin أو MAPK، التي تُعد مسؤولة عن تنظيم الجينات المرتبطة بالنقل الغشائي والسمية الذاتية.

الانخفاض الملحوظ في مستويات التعبير الجيني بعد زمن التعريض 40 ثانية، وتحديدًا في عينات 60 ثانية التي سجلت أقل القيم T60-R10 بلغت 0.12 ح، قد يُعزى إلى تضرر الأغشية أو حدوث خلل في الوظائف الحيوية للخلية بسبب التعرض المفرط للحرارة. وقد يُشير أيضًا إلى أن الفطر قد تجاوز قدرته التكيفية، مما أدى إلى تثبيط المسارات التنظيمية، وهو ما أُشير إليه في دراسة [17] حول التنظيم الديناميكي للجينات تحت تأثير الضغوط البيئية. ومن اللافت أن قيم التعبير الجيني في بعض المكررات ضمن الزمن الواحد T10-R5 و T10-R10 أظهرت تباينًا كبيرًا، مما يدل على وجود اختلافات في الاستجابة بين العزلات أو في الحالة الأيضية عند لحظة التعريض. يُحتمل أن يكون ذلك مرتبطًا بتنوع التعبير الجيني بين الخلايا أو باختلاف توزيع الطاقة الحرارية داخل وسط الزراعة أثناء المعالجة.

بناءً على هذه النتائج، يتبين أن جين *gila* يُظهر نمط استجابة مرتبطًا بمدة التعريض للموجات المايكروويفية، إذ يعكس دوره التنظيمي في طرد السموم عند تعرض الفطر لإجهاد متوسط، قبل أن يتراجع تعبيره نتيجة للضغط الحراري المفرط الذي قد يُضعف النشاط الخلوي. وتُبرز هذه الاستجابة

- hanta TK, Kang SG. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Front Microbiol.* 2021;12:673897.
6. de Castro PA, Colabardini AC, Moraes MHFd, Knowles SL, Choera T, Campitelli E, et al. Regulation of gliotoxin biosynthesis and protection in *Aspergillus* species. *PLoS Genet.* 2022;18(1):e1009965.
  7. MDPI Foods. Recent advances in non-contact food decontamination technologies: Microwave treatment of food. *Foods.* 2023;12(14):2244.
  8. Klich MN. Identification of common *Aspergillus* species. Utrecht: Centraal bureau voor Schimmelcultures; 2002.
  9. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage.* 3rd ed. New York: Springer; 2009.
  10. Bok JW, Balajee SA, Marr KA, Andes D, Nielsen KF, Frisvad JC, et al. LaeA, a regulator of morphogenetic fungal development, controls virulence in *Aspergillus*. *Nature.* 2006;444(7121):480–3.
  11. Cramer RA Jr, Gamcsik MP, Brooking RM, Najvar LK, Kirkpatrick WR, Patterson TF, et al. Disruption of a nonribosomal peptide synthetase in *Aspergillus fumigatus* eliminates gliotoxin production. *Eukaryot Cell.* 2006;5(5):972–82.
  12. Janevska S, Tudzarova G, Vucelic-Radovic B. Occurrence of ochratoxin A in grapes and wine. *Food Control.* 2018;90:46–51.

### التوصيات

يُوصى بإجراء دراسات مستقبلية تشمل أنواعاً فطرية أخرى لفحص استجابتها للمعالجة بالميكروويف. ويُفضّل توسيع نطاق الدراسة ليشمل جينات إضافية مسؤولة عن إنتاج السموم لتكوين صورة متكاملة عن التنظيم الجيني للفطريات السامة. كما يُستحسن اختبار تأثير المايكروويف في ظروف تخزين مختلفة (رطوبة، حرارة، فترة خزن) لتحديد أفضل الظروف التطبيقية. ويُنصح باستخدام تقنيات جزيئية مكتملة، مثل تحليل البروتينات أو التشخيص الجزيئي متعدد الجينات، لتعزيز موثوقية النتائج.

### المصادر

1. Food Agriculture Organization (FAO). The state of food security and nutrition in the world 2023. Rome: FAO ; 2023.
2. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol.* 2014;78:141–173.
3. Neme K, Mohammed A. Mycotoxin occurrence in cereals and exposure risk assessment in developing countries: A review. *Toxins.* 2023;15(1):38.
4. Magan N, Medina A, Aldred D. Possible climate-change effects on mycotoxin contamination of food crops pre- and postharvest. *Plant Pathol.* 2020;69(1):44–55.
5. Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mo-

13. Wiemann P, Sieber CMK, von Bargaen KW, Studt L, Niehaus EM, Espino JJ, et al. Deciphering the cryptic genome: genome-wide expression profiling of secondary metabolite gene clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Environ Microbiol*. 2014;16(10):3240–54.
14. Seo JA, Won JH, Lee YJ, Lee D, Kim MS, Lee JM. Characterization of novel gliotoxin modulating proteins in *Aspergillus fumigatus*. *Mycology*. 2023;14(2):123–31.
15. Dolan SK, O’Keeffe G, Jones GW, Doyle S. Bis-thiomethylation attenuates gliotoxin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 2020;137:103364.
16. Aimch H, Bennani L, Bellimam MA, Gadhi C. Mycotoxigenic fungal contamination in wheat storage and antifungal potential of natural products: A review. *J Appl Biosci*. 2014;80:7073–83.
17. Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(3):167–80.
18. Dolan SK, Lucid AM, Luscombe DK, Gray PP, Avery SV. A sulfide-sensing transcription factor controls gliotoxin biosynthesis and self-protection in *Aspergillus fumigatus*. *Environ Microbiol*. 2020;22(2):573–88.

