



الكشف عن مورثتي *aflR* و *omt-1* لتحديد السلالات الفطرية المفرزة لسموم الأفلاتوكسينات

Detection of *aflR* and *omt-1* Genes to Define Aflatoxigenic Strains

عبد الواحد الطحلي⁽¹⁾ سمير أبو إصبع⁽²⁾ جهاد التل⁽³⁾

Abd Alwahed Al-tahli⁽¹⁾ Samir Abou- Isba⁽²⁾ Jihad Altal⁽³⁾

alttahi@gmail.com

(1) الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، سورية.

(1) General Commission for Scientific Agricultural Research (GCSAR), Syria.

(2) قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

(2) Dep. of Plant Biology, Faculty of Science, Damascus University, Syria.

(3) وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك، سورية.

(3) Ministry of Internal Trade and Consumer Protection, Syria.

الملخص

تُسبب سموم الأفلاتوكسينات خسائر اقتصادية ومشاكل صحية للإنسان والحيوان كضعف المناعة والطفرات والسرطان والموت الجماعي إذا استهلكت بكميات كبيرة. هدفت البحث إلى التحري عن الأنواع الفطرية المرافقة لحبوب الذرة الصفراء *Zea mays* L. المخزونة في مستودعات إدارة بحوث الثروة الحيوانية في ريف دمشق (سورية)، وعزلها ودراسة النسبة المئوية لوجود أجناسها الفطرية، والتحري عن سموم الأفلاتوكسينات التي تفرزها السلالات الفطرية وتحديد أنماطها باستعمال الطرائق المعتمدة، والتمييز بين السلالات المفرزة للأفلاتوكسينات وغير المفرزة لها باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR للتحري عن المورثتين *aflR* و *omt-1*. أظهرت الدراسة أنّ الأجناس الفطرية المرافقة لحبوب الذرة الصفراء هي: *Aspergillus* spp.، *Fusarium* spp.، *Mucor* spp.، *Rhizopus* spp.، *Penicillium* spp.، كما بيّنت النتائج وجود تسلسل متغير لتردد وجود الفطريات وسيطرة الجنس *Penicillium* في فصول السنة، عدا فصل الربيع إذ كان الجنس *Aspergillus* هو الأكثر سيادة وانتشاراً. وقد تمّ تحديد 11 سلالة فطرية مفرزة للأفلاتوكسينات تنتمي إلى النوعين *A. flavus* و *A. parasiticus* من أصل 20 سلالة فطرية، وبلغت نسبة السلالات المفرزة للأفلاتوكسينات من النوع *A. flavus* 08% ولم تفرز أي سلالة من النوع *A. flavus* الأفلاتوكسينات G₁ و G₂، ولم تفرز الأنواع *A. niger* و *A. oryzae* و *Penicillium verrucosum* و *Fusarium verticillioides* أي نوع من الأفلاتوكسينات. وتبين أنّ أكثر أنماط الأفلاتوكسينات إفرازاً هو الأفلاتوكسين B₁، وبين تحليل التباين وجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية في إفراز كل سمّ، فقد أفرزت السلالة *A. flavus* sy 8 أعلى تركيز من سمّ الأفلاتوكسين B₁ (1782.9 ppb). إنّ استهداف المورثتين *aflR* و *omt-1* يُمكننا من تمييز السلالات المفرزة لسموم الأفلاتوكسينات عن السلالات غير المفرزة لها، خلصت الدراسة إلى أنّ تقانة PCR هي طريقة سريعة وحساسة تسمح بالحيطة وأقل تكلفة، ويمكن اعتمادها للكشف الأولي عن السلالات المفرزة للسموم.

الكلمات المفتاحية: الأفلاتوكسينات، HPLC، *omt-1*، *aflR*، PCR، *Aspergillus*.

Abstract

Mycotoxins cause economic losses such as productivity decrease, and health problems for humans and animals like immunity weakness, mutations, cancer and death if consumed at high levels. This research aimed to investigate the fungal species associated with *Zea mays* L. grains that are stored in the warehouses of the animal wealth research administration in Rural Damascus (Syria), isolate them, and study the percentage of these fungi, and to detect the fungal strains which excrete the aflatoxins, define Aflatoxins types using official methods, and to discriminate the aflatoxinogenic and nonaflatoxinogenic strains by PCR technique to detect the existence of two genes *aflR* and *omt-1*.

The results showed that the fungi (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp. and *Rhizopus* spp) were associated with corn, additionally, there were dynamic series of their occurrence, and the genus *Penicillium* was dominant in all seasons except in spring where the genus *Aspergillus* was the most dominant and distributed. Eleven fungal strains as aflatoxigenic species belonging to *A. flavus* and *A. parasiticus* were defined from 20 strains. The percentage of aflatoxigenic strains of *A. flavus* was 80%, and none of them produced aflatoxins G₁ and G₂. The species *A. oryzae*, *A. niger*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium verticillioides* did not produce any type of aflatoxins. Results showed that aflatoxin B₁ was the most excreted, and the statistical analysis showed significant differences between strains in excreting specific aflatoxins. Strain sy 8 of *A. Flavus* was excreted the highest concentration of aflatoxin B₁ (1782.9 ppb). We could discriminate aflatoxigenic strains by targeting two Genes *aflR* and *omt-1*. This research concluded that PCR technique is fast, sensitive, less costly and provide more precaution to detect aflatoxin contaminations, and it can be used for primarily detection of aflatoxigenic fungi.

Key words: Aflatoxins, *Aspergillus*, PCR, *aflR*, *omt-1*, HPLC.

المقدمة

تظهر الأهمية الاقتصادية لفطريات التخزين من خلال فقدان العالم نحو 2 % سنوياً من وزن المادة الجافة للحبوب نتيجة نمو الكائنات الحية عليها، وتعد الفطريات التي تنمو على الحبوب أثناء التخزين من أكثر الأحياء الدقيقة المؤثرة في خصائصها لأنها تسبب تغيرات غير مرغوبة، إضافة إلى إنتاج السموم الفطرية، وتعد الأفلاتوكسينات من النواتج الاستقلابية الثانوية للفطريات، إذ تسبب تأثيرات حيوية مختلفة ضارة، فهي سموم قوية تؤثر في الكبد ومولدة للسرطان عند الإنسان والحيوان، وتفرز بشكل رئيس من قبل سلالات فطرية عديدة، إلا أن النوعين *Aspergillus* *flavus* و *Aspergillus parasiticus* يعدان من أكثر الفطريات إفرازاً للأفلاتوكسينات. تؤثر الأفلاتوكسينات في عملية تشكيل DNA، وتنبط تركيب RNA والبروتينات مسببة تشوهات للجنين، ويمكن أن يصاب الإنسان بالتسمم الأفلاتوكسيني بشكل مباشر من خلال استهلاك منتجات ملوثة أو بشكل غير مباشر من خلال استهلاك أغذية مثل الحليب والبيض والكبد من حيوانات تمت تغذيتها بأعلاف ملوثة بالأفلاتوكسينات، وتظهر الأفلاتوكسينات في بول الإنسان ولبن الأمهات، وتنقل إلى الأطفال الرضع، ويتراكم معظمها في الكبد (Probst، 2011).

يأخذ التسمم الفطري شكلين هما التسمم الحاد والتسمم المزمن، ويحدث التسمم الحاد عند استهلاك كميات كبيرة من السموم الفطرية، ويمثل التسمم المزمن مشكلة حقيقية لأن وجود مقادير كبيرة من السموم الفطرية في الأغذية نادر الحدوث، والشائع هو وجود مستويات منخفضة من السموم التي يظهر تأثيرها تراكمياً في النواحي الآتية: هبوط في الإنتاجية (كقلة عدد البيض عند الدواجن، وتدني كمية الحليب عند الأبقار)، وضعف الخصوبة، ونفوق الطيور الصغيرة، إضافة إلى الوهن والإجهاض والإسهال وفقدان للشعر والكزاز والإصابة باليرقان والموت الجماعي وفقاً لبعض الدراسات المرجعية (محمد سعد، 1991؛ FAO، 1994؛ Qazi، 1994؛ Fayyaz، 2006). تلوث الأفلاتوكسينات معظم الأغذية والمحاصيل مثل الفول السوداني، والذرة، والقطن، والفسق الحليبي، والرز، والقمح، والشعير، والتين، والبن، والمنتجات من الحليب والجبن، والبيض واللحم والفواكه المجففة وغيرها، ما يؤدي إلى خسائر اقتصادية كبيرة، فقد أظهرت بعض الدراسات في جامعة شمالي كارولينا أن 34 % من عينات الذرة الصفراء كانت ملوثة بالأفلاتوكسينات بتركيز أعلى من 20 ppb (جزءاً في البليون) وهي النسبة المسموح باستهلاكها في الأعلاف وفقاً لمعايير هيئة الأغذية والعقاقير الأمريكية (FDA، 2002)، وهيئة المواصفات والمقاييس السورية (وزارة الصناعة في سورية، 2008). إن طرائق الكروماتوغرافيا التقليدية المعتمدة لكشف الأفلاتوكسينات مثل HPLC و TLC تحتاج إلى وقت طويل وتكاليف مرتفعة، إضافة إلى أن التصنيف التقليدي المعتمد على الخصائص الشكلية لفطريات غير دقيق كما يحتاج إلى خبرة، ويمكن أن تكون المواد الغذائية خالية من السموم أثناء تحليلها لكنها تحوي أبواغاً فطرية تكون مصدراً للأفلاتوكسينات، إذ تنمو بعد ذلك وتفرز هذه السموم عندما تتوفر

لها ظروف بيئية ملائمة، لذلك تتناول البحوث الحالية أحدث التقانات الدقيقة والسريعة والمكتملة لكشف ومراقبة وجود الفطريات المفترزة للأفلاتوكسينات باستخدام تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR). أصبح التشخيص الجزيئي من الطرائق الحساسة والسريعة لتمييز الأنواع الفطرية المختلفة وسلالاتها من خلال تصميم بادئات متخصصة تتعرف على مناطق مختارة من قطع DNA كالمورثات المسؤولة عن إفراز الأفلاتوكسينات، ثم تُستكمل العملية بتوصيف قطع DNA التي تمت مكائرتها بالرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز (El Khoury وزملاؤه، 2011؛ عبيدو ومحمود، 2008). توصلت الدراسات الجزيئية الحديثة حول جنس *Aspergillus* إلى أنه يمتلك 6 إلى 8 صيغيات، وتتألف المورثات المسؤولة عن تركيب الأفلاتوكسينات من 25 مورثة تجتمع ضمن منطقة 70 kb من DNA مجتمعة في صبغي واحد، وسميت هذه المورثات بدءاً من *aflA* إلى *aflY* وفقاً لاتفاقية تسمية المورثات (Yu وزملاؤه، 2004). من بين المورثات البنيوية المشتركة في مسار تركيب الأفلاتوكسينات مورثة تسمى *omt A* (تسمى أيضاً *omt-1*) وهي تعطي شيفرات وراثية لتحويل مركب Sterigmatocystin (ST) إلى مركب O-methyl sterigmatocystin (OMST) الذي يتحول بدوره إلى أفلاتوكسين، ومن بين المورثات المنظمة المشتركة في مسار تركيب الأفلاتوكسينات مورثة تسمى *afl R* (سميت سابقاً *afl 2* للنوع *A. flavus* و *apa 2* للنوع *A. parasiticus*). وهي تعطي شيفرات وراثية لتركيب عامل منظم هو بروتين AFLR الذي ينشط نسخ مورثات المسار البنيوية، ويؤدي ضعف نسخ هذه المورثة إلى نقص في إنتاج الأفلاتوكسينات (Trail وزملاؤه، 1995). لقد استخدم Geisen (1996) تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد Multiplex PCR مع البادئات الثلاثة: *omt-A*، *nor-1*، *ver-1* لتضخيم المورثات في مسار تركيب الأفلاتوكسينات، وحصل على نتائج إيجابية لأنموذج ثلاثي الحزم (Bands) في السلالات المفترزة للأفلاتوكسينات التابعة للنوعين *A. parasiticus* و *A. flavus*، بينما أظهرت السلالات غير المفترزة للأفلاتوكسينات تبايناً في أنموذج الحزم.

يُعدُّ تحديد الأنواع الفطرية المحلية الموجودة في الغذاء والعلف ذا أهمية عملية وتطبيقية كبيرة في جميع المجالات والدراسات البيئية والصحية والزراعية والغذائية والرقابية، إذ يدل على نوعية المواد الغذائية وجودتها، ويؤمن معلومات عن السلالات المحلية. إن اختيار السلالة الفطرية ومعرفة كفاءتها التثبيطية، وتطوير مختبرات وكوادر تستطيع إجراء تشخيص سريع للسلالات، وزيادة الوعي بمسائل الأمان الحيوي المحصولي، والحفاظ على الصحة الإنسانية والحيوانية، يُعدُّ من أهم الإجراءات التي يجب الوصول إليها وتحققها (Mauro وزملاؤه، 2015).

هدف البحث

يُستنتج مما سبق أهمية موضوع التلوث بسموم الأفلاتوكسينات والفطريات المفترزة لها على المستوى العالمي، لذلك هدف البحث إلى التحري عن الأنواع الفطرية المرافقة لحبوب الذرة الصفراء *Zea mays L.*، وعزلها ودراسة النسبة المئوية لوجود أجناسها الفطرية، والتحري عن سموم الأفلاتوكسينات التي تفرزها السلالات، وتحديد أنواعها باستخدام طرائق HPLC، والتمييز بين السلالات المفترزة للأفلاتوكسينات وغير المفترزة لها باستخدام التقانات الحيوية الجزيئية PCR، وبالتحري عن المورثتين *aflR* و *omt-1*.

مواد البحث وطرائقه

1. طريقة جمع العينات:

تم تأمين ستة أطنان من حبوب الذرة الصفراء المحلية من مركز بحوث طرطوس (سورية)، وحُزنت في أحد مستودعات إدارة بحوث الثروة الحيوانية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (2015/2014)، ثم أخذت ثلاث عينات من الذرة المخزونة والمعبأة بأكياس قنّب مرة كل ثلاثة أشهر وفقاً للطرائق المقترحة من قبل FAO (1993). تم عزل الفطريات وتصنيفها حسب الطرائق التقليدية، وهي طريقة التخفيف، ثم النشر على الوسط المغذي، وهو خلاصة الشعير Malt Extract Agar (MEA) المضاف إليها مزيج المضاد الحيوي (Oxytetracycline و Streptomycin)، وحضنت بدرجة حرارة 28° م لمدة 7 أيام لعزل الفطريات من عينات الذرة، ثم استخدمت طريقة التخطيط (Streak Method) وطريقة البوغ المفرد (Single spore) لتتقية الفطريات على وسط الشعير ووسط شابيك (Czapeck - Dox) (FAO، 1992). كما تم استخدام مزيج أزرق القطن مع اللاكتوفينول في دراسة الصفات الشكلية للفطريات وفق طريقة التخميل بالنشر بوساطة المجهر الضوئي، ثم صنّفت الأنواع الفطرية وفقاً لخصائصها الشكلية ومقارنتها وفق المراجع العلمية (Raper و Fennell، 1977؛ Dela Maza وزملاؤه، 1997؛ Reddy وزملاؤه، 2010).

2. تنمية الفطريات واستخلاص الأفلاتوكسينات:

جرى استنبات السلالات الفطرية في مختبرات قسم علم الحياة النباتية بجامعة دمشق (سورية)، وذلك بأطباق تحوي وسط خلاصة الشعير أغار بدرجة حرارة 28±2° م لمدة 7 أيام للحصول على سلالات نقية، ثم غُمرت الأطباق بالماء المقطر المعقم المضاف إليه بولي سوربات Tween 80 بتركيز 0.01% لتحسين توزيع الأبواغ والحصول على معلق متجانس. استُخلصت الأفلاتوكسينات وفق طريقة Criseo وزملائه (2001)، إذ أُضيف 1 مل من المعلق البيوعي لكل عزلة (10⁶ بوغ/مل) إلى 100 مل من خلاصة الشعير السائل Malt Extract Broth، وحُضنت في الحاضنة

الرجاجة بسرعة دوران 160 دورة/دقيقة لمدة سبعة أيام في درجة حرارة $2\pm 30^{\circ}\text{C}$ ، بعد ذلك أُضيف إلى الوسط المغذي 150 مل من الكلوروفورم، وُخلطت المحتويات بالرجاجة لمدة 60 دقيقة، ثم رُشحت لفصل المشيجة الفطرية، وفُصلت طبقة الكلوروفورم السفلية بقمع الفصل، وُجفت بجهاز المبخّر الدوار في درجة حرارة 60°C ، وأعيد إذابة البقايا بإضافة 1 مل من الميثانول النقي، واستُخدم هذا المحلول لكشف الأفلاتوكسينات بطريقة HPLC (Imtiaz, 2011).

3. طريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

كُشفت الأفلاتوكسينات وفق طريقة Hajare وزملائه (2006)، إذ فُصلت الأفلاتوكسينات باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC (Shimadzu-اليابان) في مختبر مديرية الشؤون الفنية والجودة والمخابر التابعة لوزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك (سورية)، والذي يتألف من مضخة طراز LC-10AT، وحجرة حقن Injection loop حجمها 50 ميكروليتراً، وفرن طراز CTO-10A، وحاقل آلي SHIMADZU SIL-20A، وعمود فصل نوع C18 (mm250x4.6) من Merck، والجهاز مزود بكاشف تألق Fluorescence detector طراز RF-10AX بطول موجة Excitation 350 نانومتراً، وطول موجة Emission 450 نانومتراً، ويتصل الجهاز بحاسوب لتخزين البيانات ومعالجتها وفق نظام Class-Solution. واستُخدم الطور المتحرك المكوّن من مزيج من الميثانول والأسيتونتريل والماء منزوع الشوارد بنسبة (60:20:20)، ومعدل التدفق 1.3 مل/دقيقة (Younis وMalik، 2003؛ Ghaziaskar وSheibani، 2008).

4. استخلاص الدنا DNA وتحديد مورثتي aflR وomt-1:

أُضيف 1 مل من المعلق البوغي لكل عزلة (10^6 بوغية/مل) إلى 100 مل من مستخلص الشعير السائل Malt Extract Broth، وحُضنت في الحاضنة الرجاجة بسرعة دوران 170 دورة/دقيقة لمدة خمسة أيام في درجة حرارة $2\pm 30^{\circ}\text{C}$ ، بعد ذلك رُشح المستنبت السائل للحصول على المشيجة الفطرية الرطبة، ثم جُففت بدرجة حرارة 37°C لمدة ساعتين. واستخلص الدنا الجينومي بطريقة فينول، كلوروفورم، إيزوأميل الكحول وفق Reddy وزملائه (2009) و Rahimi وزملائه (2006)، ثم أُذيب راسب الدنا الناتج في 100 ميكروليتر من المحلول الموقى TE (Luo وزملاؤه، 2014).

لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR استُخدمت مجموعتان من البادئات الخاصة (شركة Eurofins Genomics) لكشف وجود المورثتين aflR (مورثة منظمّة) و omt-1 (مورثة بنيوية) (Criseo وزملاؤه، 2001؛ Erami وزملاؤه، 2007)، وكانت كالآتي:

aflR F: 5-TAT CTC CCC CCG GGC ATC TCC CGG-3؛ aflR R: 5-CCG TCA GAC AGC CAC TGG ACA CGG-3.

التي تضخّم قطعة من الدنا DNA بطول 1032 شفعاً قاعدياً.

omt-1 F: 5-GGC CCG GTT CCT TGG CTC CTA AGC-3؛ omt-1 R: 5-CGC CCC AGT GAG ACC CTT CCT CGC-3.

والتي تضخّم قطعة من الدنا DNA بطول 1232 شفعاً قاعدياً.

أجري تفاعل PCR ضمن حجم نهائي 25 ميكروليتر: 50 نانوغرام من قالب الدنا الجينومي و 12.5 ميكروليتر من محلول Taq 2X Master Mix (الحاوي على أنزيم تضاعف الدنا و dNTPs وكلور المغنيزيوم، وكلور البوتاسيوم وصبغات التتبع، وبعض المواد التي تحافظ على استقرار فاعلية أنزيم تضاعف الدنا) و 250 نانو مول من كل مرتسبة، وتم إضافة ماء مقطر معقم خالٍ من الشوارد و DNase و RNase لإكمال الحجم النهائي إلى 25 ميكروليتر. وأجري هذا التفاعل في جهاز التدوير الحراري (Gene Pro Thermal cycler موديل TC-E-96G) وفقاً للبرنامج التالي: دورة واحدة لمدة ثلاثة دقائق بدرجة حرارة 94°C ، تلاها 35 دورة، كل منها مؤلفة من دقيقة واحدة على 94°C ، ودقيقة واحدة على 63°C و دقيقتين على 72°C وأجريت الدورة الأخيرة بفترة حضانة نهائية لمدة 10 دقائق على 72°C ثم التبريد حتى درجة الحرارة 4°C ثم فصل نواتج تفاعل PCR باستخدام الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز 1.2% المحتوية على مادة الإثيديوم بروميد ضمن المحلول الموقى 1x TBE، ثم شوهدت وصورت الحزم الناتجة تحت الأشعة فوق البنفسجية، واستعمل سلم الدنا المعياري DNA Ladder 100bp للتمكن من تمييز قطع الدنا مضاعفة الجديلة المطلوبة. كان هناك شاهد سلبي مع كل تفاعل يتم به إضافة الماء المقطر المعقم الخالٍ من الشوارد والأنزيمات المحطمة للدنا بدلاً من دنا العينة، وذلك للتأكد من عدم تلوث المواد الداخلة في التفاعل بالدنا الغريب، وأعيد التفاعل مرتين على أقل تقدير لضمان تكرارية إنتاج الحزم (الفصيلي، 1999).

5. التحاليل الإحصائية:

استُخدم اختبار فيشر Fisher بطريقة تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (1-Way Randomized Blocks-1WRB.AOV)، لتحليل تباين النسب المئوية للأجناس الفطرية وفق نظام القطع المنشقة Split Block بالزمن بثلاثة مكررات، إذ وُزعت الأجناس في القطع الرئيسية الخمس (Whole plots)، ثم أخذت النسب المئوية لوجود الأجناس الفطرية من القطع الرئيسية نفسها في المواعيد الخمسة (شتاء 1، ربيع، صيف، خريف، شتاء 2)، واعتبرت الفصول تمثل قطعاً منشقة Split plot بالزمن. ثم قورنت الفروقات بين متوسطات الأصناف، ومواعيد أخذ العينات بطريقة Duncan. واستخدم تصميم القطاعات العشوائية الكاملة لتحليل التباين بين السلالات الفطرية المفترزة لكل سم، وتم تحديد أقل فرق معنوي عند مستوى دلالة 1% وفق تحليل التباين ANOVA باستخدام برنامج (Costat Version 6).

النتائج والمناقشة

أولاً: النسبة المئوية لوجود الأجناس الفطرية:

تتميز الفطريات المعزولة إلى خمسة أجناس فطرية هي: *Aspergillus spp.*، و *Penicillium spp.*، و *Fusarium spp.*، و *Rhizopus spp.*، و *Mucor spp.*، ويوضح الجدول 1 متوسطات النسب المئوية لتردد وجود الأجناس الفطرية المسجلة خلال الدراسة. إذ يُلاحظ وجود تسلسل متغير لوجود الفطريات، فقد ظهر الجنس *Fusarium* بنسبة $0.4 \pm 6.6\%$ في بداية التخزين فقط نتيجة توفر رطوبة عالية وهو من مجموعة فطور الحقل، وبدأ ظهور الجنس *Rhizopus spp.* بنسبة منخفضة ($0.7 \pm 2.27\%$) في فصل الصيف، بينما ظهر الجنس *Mucor spp.* بنسبة منخفضة أيضاً ($2 \pm 2.0\%$) مع انخفاض الرطوبة في نهاية فترة التخزين، ووجدت أنواع الجنس *Penicillium* و *Aspergillus* طول فترة الدراسة وبنسب مرتفعة، ولوحظ سيطرة أنواع الجنس *Penicillium spp.* عدا فصل الربيع، إذ كانت أنواع الجنس *Aspergillus* الأكثر سيادة وبنسبة بلغت $4 \pm 64.67\%$ ، ويدل ذلك على وجود سموم فطرية ضارة بالصحة. كما لوحظ ارتفاع نسبة وجود الجنس *Aspergillus spp.* في فترتين حرجيتين (فصلي الربيع والخريف)، وقد يُعزى ذلك إلى توفر ظروف بيئية مناسبة لنمو هذا الجنس، ولأن معظم الفطريات معتدلة الحرارة وأي ارتفاع أو انخفاض فيها عن الحدود المثلى يؤثر سلباً في نشاطها، وبهذا يُلاحظ أن الحمولة الفطرية تتغير كما ونوعاً مع الزمن حسب العوامل البيئية والشروط المناسبة لنموها، ويُفسر ذلك بالتفاعل المستمر بين درجة حرارة الحبوب ومحتواها الرطوبي وتحقيق التوازن الرطوبي النسبي (النشاط المائي)، وتتوافق النتائج مع العديد من الدراسات والأبحاث السابقة (Barros وزملاؤه، 2005؛ Amadi و Adeniyi، 2009). ولوحظ من خلال التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية بين النسبة المئوية لوجود جنس *Aspergillus* و جنس *Penicillium* من جهة وبين باقي الأجناس من جهة أخرى، مع عدم وجود فروق معنوية بين بقية الأجناس عند مستوى دلالة 1 %، إذ سُجل أعلى متوسط لنسبة وجود الأجناس وهو $10 \pm 53.5\%$ لجنس *Penicillium*، تلاه الجنس *Aspergillus* ($12 \pm 42.5\%$)، ثم الجنس *Rhizopus* بنسبة بلغت $2 \pm 2.2\%$ ، تلاه الجنس *Fusarium* بنسبة قدرها $0.2 \pm 1.3\%$ ، ثم الجنس *Mucor* ($0.08 \pm 0.5\%$)، ويعني ذلك اختلاف وجود الأجناس الفطرية بين فصل وآخر.

الجدول 1. متوسطات النسب المئوية (%) لوجود الأجناس الفطرية المسجلة خلال فترة البحث.

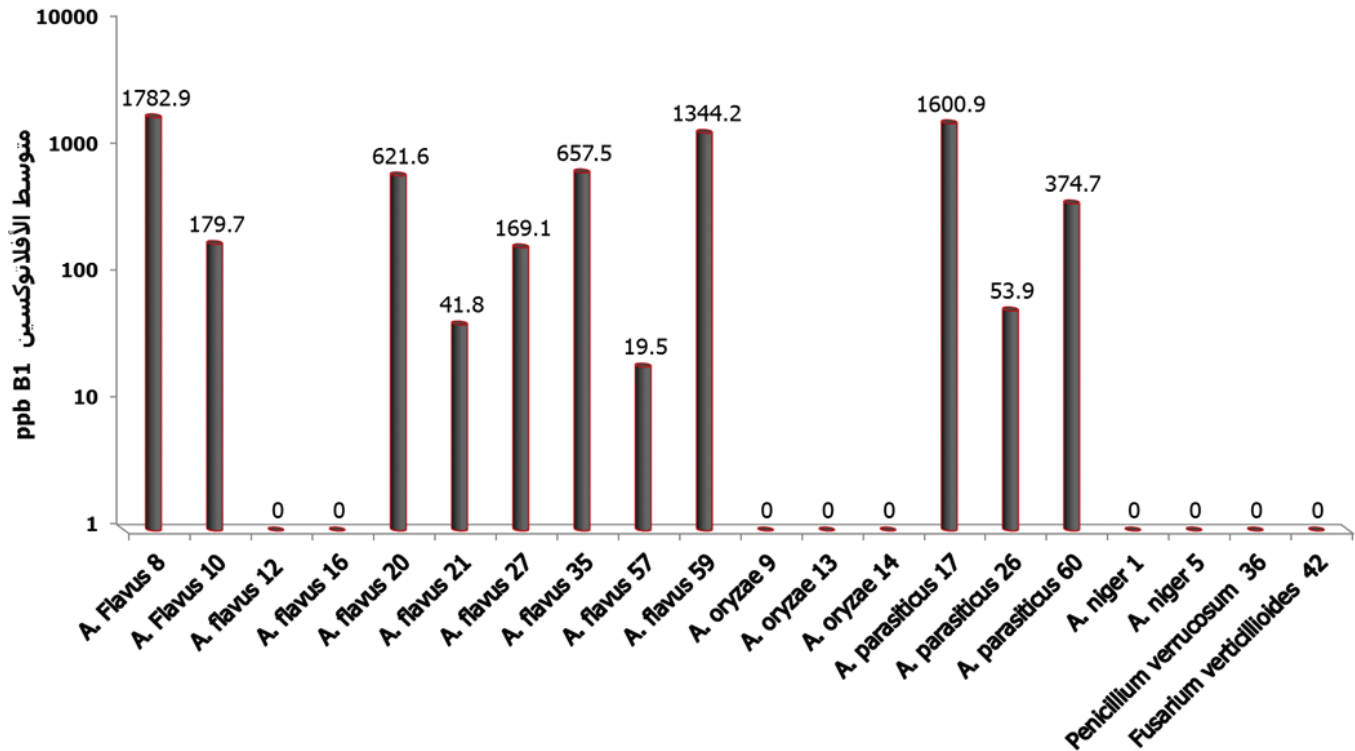
| متوسط الفصل | متوسط النسبة المئوية لوجود الأجناس الفطرية (%) | | | | | الفصول | |
|--------------------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|---------------------|
| | <i>Mucor</i> | <i>Rhizopus</i> | <i>Fusarium</i> | <i>Penicillium</i> | <i>Aspergillus</i> | | |
| 19.99 ^a | 0.00 | 0.00 | 6.60±0.4 | 54.37±0.7 | 39.00±1 | شتاء1 | |
| 19.99 ^a | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 35.30±4 | 64.67±4 | ربيع | |
| 19.99 ^a | 0.00 | 2.27±0.7 | 0.00 | 61.50±2 | 36.20±3 | صيف | |
| 20.00 ^a | 0.00 | 1.47±1 | 0.00 | 57.23±3 | 41.30±2 | خريف | |
| 20.00 ^a | 2.00±2 | 7.27±2 | 0.00 | 59.33±1 | 31.40±3 | شتاء2 | |
| 20.00 ^a | 0.50±08.0 ^c | 2.20±2 ^c | 1.32±0.2 ^c | 53.55±10 ^a | 42.51±12 ^a | متوسط الجنس | |
| | التفاعلي = 6.71 | | الجنس = 2.21 | | الفصل = 1.75 | | LSD _{0.01} |

يدل وجود أحرف متشابهة على عدم وجود المعنوية الاحصائية في المقارنات المختلفة عند مستوى معنوية 0.01.

ثانياً: نتائج الاختبارات الكيميائية وقياس تركيز سموم الأفلاتوكسينات بطريقة HPLC:

يوضح الشكل 1 متوسط تركيز الأفلاتوكسين B1 المفرز من السلالات الفطرية المختلفة، ويُلاحظ أن أكثر أنماط الأفلاتوكسينات إفرازاً هو الأفلاتوكسين B1، وقد أفرزته 11 سلالة بتراكيز مختلفة، ولوحظ تحرر الأفلاتوكسينات على التوالي: B1، B2، G1، G2 عند الزمن 7.2، 8.1، 9.3، 11.2 دقيقة على التوالي.

تمّ تحديد 11 سلالة فطرية مفرزة للأفلاتوكسينات تنتمي إلى النوعين *A. parasiticus* و *A. flavus* من بين 20 عزلة فطرية حُضنت في مستخلص الشعير السائل وفي الحاضنة الرجاجة لمدة سبعة أيام في درجة حرارة 30°م (الجدول 2)، وبيّنت النتائج أن 8 سلالات من أصل 10 من النوع *A. flavus* أفرزت الأفلاتوكسين B1، أي أن نسبة السلالات المفرزة للأفلاتوكسين B1 من النوع *A. flavus* كانت 80 %، وبلغت نسبة السلالات من النوع *A. flavus* القادرة على إفراز نمطي الأفلاتوكسينات B1 و B2، 20 %، في حين استطاعت جميع سلالات النوع *A. parasiticus* أن تُفرز الأفلاتوكسينات B1 و G1 في آن واحد.



الشكل 1. متوسط تركيز الأفلاتوكسين B₁ المفرز من السلالات الفطرية المختلفة (مقياس لوغاريتمي).

أظهر تحليل التباين ANOVA بين السلالات الفطرية عند مستوى دلالة 1 % عدم وجود فروق معنوية بين المكررات، وهذا يعني دقة في إجراء التحاليل، ووجود فروق معنوية بين السلالات الفطرية في إفراز كل سم، فقد أفرزت السلالة 8 *A. flavus* أعلى تركيز من الأفلاتوكسين B₁ (1782.9 ppb)، ويدل ذلك على قوة هذه السلالة في إفراز السم، وأفرزت السلالتان رقم 35 و *A. flavus* sy 57، ولم تفرز السلالتان رقم 16sy و 12sy أي نوع من الأفلاتوكسينات، كما لم تفرز أي سلالة من النوع *A. flavus* الأفلاتوكسينات G1 و G2، بينما كانت سلالات النوع *A. parasiticus* قادرة على إفراز الأفلاتوكسينات B1 و B2، ولم تفرز الأنواع *A. niger*، *Penicillium*، *A. oryzae*، *Fusarium verticillioides*، أي نوع من الأفلاتوكسينات، ويتوافق ذلك مع العديد من الدراسات (Younis وزملاؤه، 2003؛ Navya وزملاؤه، 2013؛ Kim وزملاؤه، 2013). أشار Rashid وزملاؤه (2008) و Medina وزملاؤها (2014) إلى أن درجة الحرارة المناسبة لإفراز الأفلاتوكسينات تقع بين 25° م و 35° م، ودرجة الحرارة 2±30° م هي المثلى لإفراز هذه السموم، لذلك جرى اعتماد هذه الدرجة في تحضين السلالات، وأشارت دراسات أخرى إلى بعض الأوساط الغذائية التي تحفز إفراز الأفلاتوكسينات كالمواد الغذائية الغنية بالنشويات والبروتينات العضوية الطبيعية، لذلك جرى اعتماد الوسط الغذائي خلاصة الشعير Malt Extract (Das وزملاؤه، 2013؛ Criseo وزملاؤه، 2001). بيّنت نتائج هذه الدراسة أن نسبة السلالات من النوع *A. flavus* المفرزة للأفلاتوكسينات بلغت نحو 80 %، بينما أشار Rahimi وزملاؤه (2006) في دراسة أجريت على الأفلاتوكسينات الملوثة للستق الحليبي في مناطق مختلفة في إيران إلى أن هذه النسبة بلغت 30 %، ويمكن الاستنتاج أن الأنواع الفطرية المفرزة للأفلاتوكسينات تنتمي إلى النوعين *A. flavus* و *A. parasiticus*، ويعزى ذلك للعوامل البيئية والجغرافية والظروف المناسبة لنمو الفطريات، وأنه بالرغم من أن الأفلاتوكسينات تفرز أساساً من أنواع تنتمي إلى جنس *Aspergillus*، لكن ليس جميع سلالات هذه الأنواع قادر على إفراز هذه الأفلاتوكسينات، ويتوافق ذلك مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى أن أكثر من 90 % من سلالات النوع *A. parasiticus* مفرزة للأفلاتوكسينات، بينما 50 % من سلالات النوع *A. flavus* قادرة على إفراز الأفلاتوكسينات (Younis وزملاؤه، 2003؛ Mngadi، 2007؛ Navya وزملاؤه، 2013).

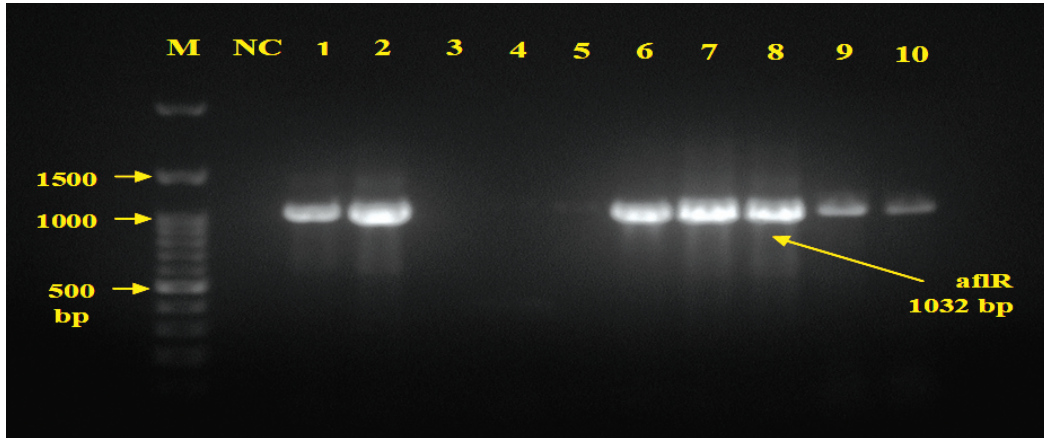
الجدول 2. متوسط تركيز الأفلاتوكسينات G₁، G₂، B₁، B₂ المفترزة من السلالات الفطرية المختلفة.

| متوسط إفراز الأفلاتوكسين G ₂ (ppb) | متوسط إفراز الأفلاتوكسين G ₁ (ppb) | متوسط إفراز الأفلاتوكسين B ₂ (ppb) | متوسط إفراز الأفلاتوكسين B ₁ (ppb) | السلالة ورقمها |
|---|---|---|---|---------------------------------------|
| 0 ^d | 0 ^b | 0 ^c | 1782.9±2.9 ^a | <i>Aspergillus flavus</i> sy 8 |
| 0 | 0 | 0 | 179.7±2.8 ^g | <i>A. flavus</i> sy 10 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. flavus</i> sy 12 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. flavus</i> sy 16 |
| 0 | 0 | 0 | 621.6±2.5 ^e | <i>A. flavus</i> sy 20 |
| 0 | 0 | 0 | 41.8±2.5 ^j | <i>A. flavus</i> sy 21 |
| 0 | 0 | 0 | 169.1±1.0 ^h | <i>A. flavus</i> sy 27 |
| 0 | 0 | 35.1±0.2 ^b | 657.5±1.7 ^d | <i>A. flavus</i> sy 35 |
| 0 | 0 | 634.5±2.9 ^a | 19.5±0.3 ^k | <i>A. flavus</i> sy 57 |
| 0 | 0 | 0 | 1344.2±3.7 ^c | <i>A. flavus</i> sy 59 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. oryzae</i> sy 9 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. oryzae</i> sy 13 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. oryzae</i> sy 14 |
| 0 | 739.9±2.6 ^b | 0 | 1600.9±3.0 ^b | <i>A. parasiticus</i> sy 17 |
| 0 | 81.5±1.0 ^c | 0 | 53.9±1.4 ⁱ | <i>A. parasiticus</i> sy 26 |
| 0 | 953.3±2.0 ^a | 0 | 374.7±2.4 ^f | <i>A. parasiticus</i> sy 60 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. niger</i> sy 1 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>A. niger</i> sy 5 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>Penicillium verrucosum</i> sy 36 |
| 0 | 0 | 0 | 10 | <i>Fusarium verticillioides</i> sy 42 |
| - | 2.1 | 1.8 | 4.6 | LSD _{0.01} |

* يدل وجود الأحرف المتشابهة (a, b, c, d, ...) على عدم وجود الدلالة الإحصائية في المقارنات المختلفة عند مستوى معنوية 1 %.

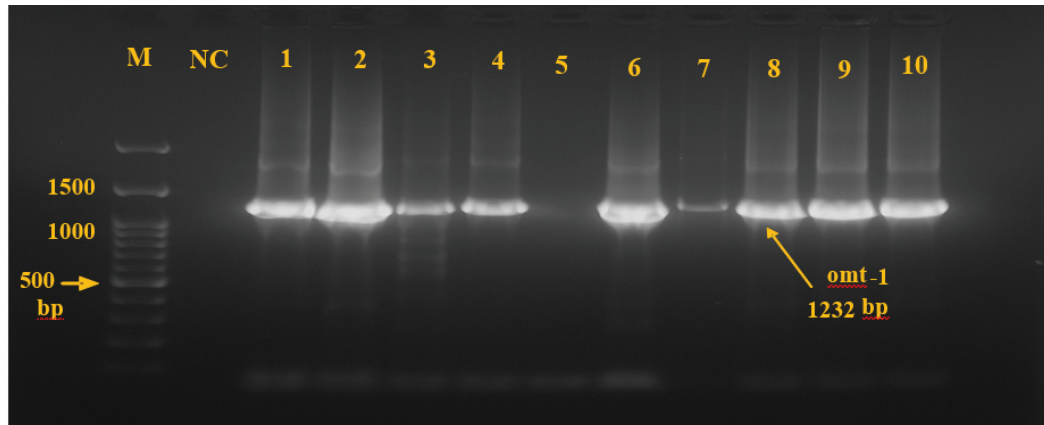
ثالثاً: نتائج الاختبارات المورثية الجزيئية:

توضح الأشكال 2 و 3 و 4 و 5 نتائج تفاعل PCR بعد الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز 1.2 % للمورثتين *afIR* و *omt-1*، فقد رمزت وضخمت بادئنا *afIR* القطعة المتوقعة من الدنا DNA بطول 1032 زوجاً قاعدياً في 8 سلالات من النوع *A. flavus* من أصل 10 سلالات، وفي 3 سلالات من النوع *A. parasiticus*، وقد تمثّل ذلك بظهور الحزم في الرحلان الكهربائي على هلام الأغاروز. ظهرت حزمة قطعة المورثة *afIR* في السلالة *A. oryzae* sy 13 من أصل 3 سلالات من النوع *A. oryzae* (الشكل 2)، بينما لم تظهر أي حزمة لمنتج المورثة *afIR* من السلالات التي تنتمي إلى الأنواع *A. Niger*، *Penicillium verrucosum*، *Fusarium verticillioides*، وهذا متوقع لأن هذه السلالات تنتمي إلى أنواع ذُكرت في دراسات عديدة على أنها غير قادرة على إفراز الأفلاتوكسينات (Erami وزملاؤه، 2007). بشكل مشابه ضخمت بادئنا *omt-1* القطعة المتوقعة من الدنا DNA بطول 1232 زوجاً قاعدياً في جميع سلالات النوع *A. flavus*، وكانت الحزمة ضعيفة الكثافة نسبياً في السلالتين رقم 12 و 16 (الشكل 3).



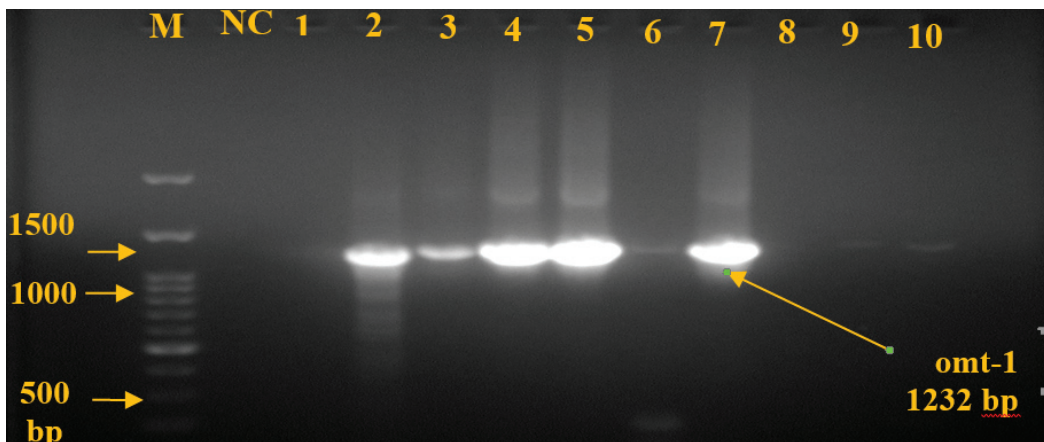
الشكل 2. ناتج تضخيم دنا السلالات الفطرية باستعمال زوج البادنة *afIR*، المسرب M: السلم الجزيئي 100 زوج قاعدي.

المسرب NC: شاهد سلبي Negative Control ، المسارب الممثلة للسلالات: 1: *Aspergillus flavus* 8 ، 2: *A. flavus* 12 ، 3: *A. flavus* 10 ، 4: *A. flavus* 16 ، 5: *A. niger* 1 ، 6: *A. flavus* 21 ، 7: *A. oryzae* 13 ، 8: *A. parasiticus* 17 ، 9: *A. flavus* 57 ، 10: *A. flavus* 59



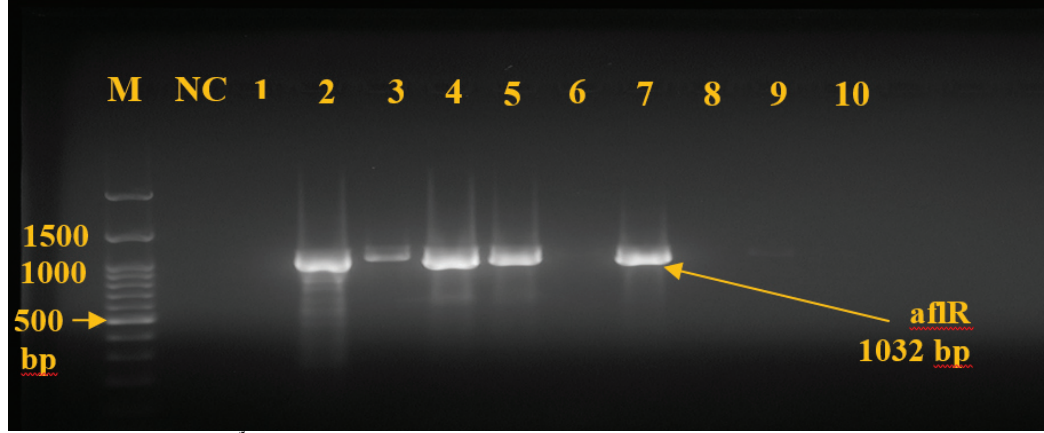
الشكل 3. ناتج تضخيم دنا السلالات الفطرية باستعمال زوج البادنة *omt-1*، المسرب M: السلم الجزيئي 100 زوج قاعدي.

المسرب NC: شاهد سلبي Negative Control ، المسارب الممثلة للسلالات: 1: *Aspergillus flavus* 8 ، 2: *A. flavus* 10 ، 3: *A. flavus* 12 ، 4: *A. flavus* 16 ، 5: *A. niger* 1 ، 6: *A. flavus* 21 ، 7: *A. oryzae* 13 ، 8: *A. parasiticus* 17 ، 9: *A. flavus* 57 ، 10: *A. flavus* 59



الشكل 4. ناتج تضخيم دنا السلالات الفطرية باستعمال زوج البادنة *omt-1*، المسرب M: السلم الجزيئي 100 زوج قاعدي.

المسرب NC: شاهد سلبي Negative Control ، المسارب الممثلة للسلالات: 1: *A. oryzae* 9 ، 2: *A. flavus* 27 ، 3: *A. parasiticus* 60 ، 4: *A. flavus* 35 ، 5: *A. parasiticus* 26 ، 6: *A. oryzae* 14 ، 7: *A. flavus* 20 ، 8: *A. niger* 5 ، 9: *Penicillium verrucosum* 36 ، 10: *Fusarium verticillioides* 48



الشكل 5. ناتج تضخيم دنا السلالات الفطرية باستعمال زوج البادئة *aflR*، المسرب M: السلم الجزيئي 100 زوج قاعدي.

المسرب NC: شاهد سلبي Negative Control ، المسارب الممثلة للسلالات: 1: *A. oryzae* 9 ، 2: *A. flavus* 27 ، 3: *A. parasiticus* 60 ، 4: *A. flavus* 35 ، 5: *A. parasiticus* 26 ، 6: *A. oryzae* 14 ، 7: *A. flavus* 20 ، 8: *A. niger* 5 ، 9: *Penicillium verrucosum* 36 ، 10: *Fusarium verticillioides* 24

وظهرت حزمة قطعة المورثة *omt-1* في جميع سلالات النوع *A. parasiticus*، وقد ظهرت حزمة قطعة المورثة *omt-1* في السلالة *A. oryzae* SY 13 من أصل 3 سلالات من النوع *A. Oryzae*، وكانت الحزمة ضعيفة الكثافة نسبياً، بينما لم تظهر أي حزمة من السلالات المنتمية للأنواع *A. Niger*، *Penicillium verrucosum*، *Fusarium verticillioides*

ضخمت 8 سلالات من أصل 10 من النوع *A. flavus* قطعنا الدنا DNA عند استهداف المورثتين معاً، وكانت الاستجابة إيجابية في إفراز الأفلاتوكسينات، وضخمت جميع سلالات النوع *A. parasiticus* قطعنا الدنا DNA عند استهداف المورثتين معاً، وكانت الاستجابة سلبية في باقي السلالات، ويدل ذلك على حساسية طريقة PCR (الجدول 3).

عند مناقشة النتائج تبين أن وجود المورثة *aflR* وعدم قدرة بعض السلالات على إفراز الأفلاتوكسينات يعزى إلى خلل في تعبير هذه المورثة وفعاليتها بسبب طفرة معينة أو غياب بروتين *AflR* الخاص بهذه المورثة، وعدم توظيفه لأن mRNA لهذه المورثة يتميز بدور ما في بداية الاستقلاب الثانوي، ولا يرتبط مباشرة بإنتاج الأفلاتوكسينات، أي أن عرقلة نسخ وفعالية هذه المورثة يؤدي إلى عدم إنتاج الأفلاتوكسينات بغض النظر عن وجودها أو عدمه، ويُعد غياب هذه المورثة حلاً عملياً لاختيار سلالة فطرية سليمة لا تفرز الأفلاتوكسينات (Trail وزملاؤه، 1995).

يعزى عدم إفراز الأفلاتوكسينات في بعض السلالات مثل السلالة *A. oryzae* sy 13 بالرغم من وجود المورثتين *aflR* و *omt-1* إلى حدوث طفرات وراثية أدت إلى تعطيل مسار تركيب الأفلاتوكسينات في تلك السلالات، وإلى فقدان قدرة الأنواع الفطرية المفترزة للسموم على إفراز الأفلاتوكسينات خلال إعادة زرعها وتنقيتها حسب الدراسات المرجعية (Geisen، 1996؛ Criseo وزملاؤه، 2001).

أشار Liu و Chu (1998) إلى أن إفراز الأفلاتوكسينات متعلق بشكل مباشر بتعبير المورثة *aflR*، وأن مستوى هذه المورثة في درجة حرارة 29°م كان أعلى بأربع مرات من مستواها في الدرجة 37°م، وكذلك لم يظهر أي أثر للمورثة *omtA* عند هذه الدرجة. إن الأنواع الفطرية غير المفترزة للأفلاتوكسينات مثل *A. oryzae* و *A. sojae* تمتلك بعض المورثات الضرورية في مسار تركيب الأفلاتوكسينات مثل (*nor-1*، *ver-1*، *aflR*)، إذ أظهرت التحاليل وجود *aflR mRNA* عند هذه الأنواع، ولكن لم يُكشَف عن *omtA mRNA* في أي سلالة منها، وقد سمي نمط المورثة *aflR* الموجود في هذه الأنواع غير المفترزة للسموم بنمط النوع (*A. oryzae* type) *A. oryzae*، إذ يحتوي على التاييمين T بدلاً من السيتوزين C في منطقة المحفز، ويشابه تماماً نمط النوع *A. flavus aflR*، لكنه مختلف مع نمط النوعين *A. sojae* و *A. parasiticus*، وفي حالة احتواء سلالة من النوع *A. flavus* على نمط المورثة *aflR* المسمى نمط النوع *A. oryzae* (*A. oryzae* type) فإن هذه السلالة لا تفرز الأفلاتوكسينات (Liu و Chu، 1998؛ Lee وزملاؤه، 2006؛ Rashid وزملاؤه، 2008؛ Abdulateef، 2014؛ Medina وزملاؤها، 2014؛ Salaman وزملاؤه، 2015).

لقد اقترح Mayer وزملاؤه (2003) أن وجود الحمض النووي المرسل mRNA أو عدم وجوده يسمح بتمييز مباشر بين السلالات المفترزة للسموم وغير المفترزة لها، وتبين وجود ارتباط قوي بين تعبير المورثات عن نفسها وبين إفراز الأفلاتوكسينات (Shweta وزملاؤه، 2013).

الجدول 3. نتائج المقارنة بين الطرائق التقليدية والطرائق الجزيئية (HPLC و PCR*) لكشف قدرة السلالات الفطرية المختلفة على إفراز الأفلاتوكسينات (B₁، B₂، G₁، G₂).

| إفراز الأفلاتوكسينات | نتائج PCR | | نتائج HPLC | السلالة ورقمها |
|----------------------|-----------|------|---------------------------------|---------------------------------------|
| | omt-1 | aflR | | |
| + | + | + | B ₁ | <i>Aspergillus flavus</i> sy 8 |
| + | + | + | B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 10 |
| - | -+ | - | - | <i>A. flavus</i> sy 12 |
| - | -+ | - | - | <i>A. flavus</i> sy 16 |
| + | + | + | B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 20 |
| + | + | + | B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 21 |
| + | + | + | B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 27 |
| + | + | + | B ₂ و B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 35 |
| + | + | + | B ₂ و B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 57 |
| + | + | -+ | B ₁ | <i>A. flavus</i> sy 59 |
| - | - | - | - | <i>A. oryzae</i> sy 9 |
| - | -+ | + | - | <i>A. oryzae</i> sy 13 |
| - | - | - | - | <i>A. oryzae</i> sy 14 |
| + | + | + | G ₁ و B ₁ | <i>A. parasiticus</i> sy 17 |
| + | + | + | G ₁ و B ₁ | <i>A. parasiticus</i> sy 26 |
| + | + | -+ | G ₁ و B ₁ | <i>A. parasiticus</i> sy 60 |
| - | - | - | - | <i>A. niger</i> sy 1 |
| - | - | - | - | <i>A. niger</i> sy 5 |
| - | - | - | - | <i>Penicillium verrucosum</i> sy 36 |
| - | - | - | - | <i>Fusarium verticillioides</i> sy 42 |

* PCR: Polymerase Chain Reaction, HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

+ : إشارة طبيعية (إيجابي)، - : إشارة ضعيفة (إيجابي)، - : عدم وجود إشارة (سلب).

لقد أظهرت المقارنة بين بيانات PCR ونتائج HPLC في هذه الدراسة أن تقانة PCR طريقة سريعة وحساسة وأقل تكلفة لكشف حالة التلوث بالفطريات المفززة للأفلاتوكسينات، ويمكن اعتمادها لكشف أولي عن السلالات المفززة للأفلاتوكسينات، ويتفق ذلك مع دراسات سابقة (Al-Hmoud وزملاؤها، 2012)، وعند الضرورة في حالة الدراسات المعمقة يمكن اللجوء إلى اختبارات real-time PCR، وطريقة النسخ العكسي Reverse Transcription (RT-PCR) (Degola وزملاؤها، 2007؛ Luo وزملاؤها، 2014). إن تحديد وتصنيف الأنواع الفطرية التقليدية المعتمد على الخصائص الشكلية للفطريات غير دقيق كما يحتاج إلى خبرة، ولاسيما عند التمييز بين الأنواع المتشابهة والقريبة من بعضها مثل قسم Flavi من جنس *Aspergillus*، لذلك تبرز الحاجة لاستعمال طرائق دقيقة وحديثة لكشف ومراقبة وجود الفطريات، ولاسيما المفززة للأفلاتوكسينات، فقد اقترح Liu و Chu (1998) استعمال المورثة aflR لاختبار إمكانية إفراز الأفلاتوكسينات من جنس *Aspergillus* قسم Flavi، وقد استهدفت هذه الدراسة مورثتين للكشف عن السلالات الفطرية المفززة للأفلاتوكسينات هما *aflR* و *omt-1*. وذلك بسبب أهميتهما في تركيب الأفلاتوكسينات، بينما استهدفت دراسات أخرى مورثات إضافية، وكانت النتائج متوافقة مع نتائج هذه الدراسة (Criseo وزملاؤها، 2001؛ Erami وزملاؤها، 2007)، وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن استعمال هذه المورثات يساعد على تمييز السلالات المفززة لسموم الأفلاتوكسينات عن السلالات غير المفززة لها. إن السلالات الفطرية غير المفززة لسموم الأفلاتوكسينات الناتجة في الدراسة الحالية لها أهمية كبيرة في استشراف دراسات مستقبلية ضمن الشروط المختبرية والحقلية لمعرفة فعاليتها وقدرتها على منع السلالات المفززة للأفلاتوكسينات

من إفراز السم وتلويث المحاصيل الغذائية، إذ تتجه الأبحاث العلمية الحديثة في جميع أنحاء العالم نحو مكافحة الحيوية للفطريات المنتجة لسموم الأفلاتوكسينات عن طريق استعمال المنافسة بين الفطريات والمنع التنافسي المثبط لإنتاج الأفلاتوكسينات، فقد أظهرت دراسات سابقة انخفاض التلوث بالأفلاتوكسينات قبل حصاد الذرة بنسبة 80 إلى 95% عند استعمال سلالات فطرية غير مفرزة للأفلاتوكسينات لاستبعاد السلالات المفرزة للسموم، وقد أثبتت فعالية مكافحة الحيوية ضمن ظروف التخزين (Navya وزملاؤه، 2013؛ Ehrlich، 2014؛ Probst وزملاؤه، 2014).

الاستنتاجات:

يُستنتج انتشار عدد كبير من الأنواع الفطرية المفرزة للأفلاتوكسينات في حبوب الذرة الصفراء المخزونة في سورية، وهناك تسلسل متغير لوجود الفطريات مع الزمن، والأجناس الأكثر سيادة وانتشاراً هي *Aspergillus* و *Penicillium*، وهو مؤشر على وجود التلوث بسموم الأفلاتوكسينات، ومن بين 20 عزلة فطرية وجد 11 عزلة مفرزة للأفلاتوكسينات، والتي تنتمي إلى النوعين *A. flavus* و *A. parasiticus*، وبالتالي ليس جميع سلالات هذه الأنواع قادرة على إفراز الأفلاتوكسينات. إن أكثر أنماط الأفلاتوكسينات إفرازاً هو الأفلاتوكسين B₁، ووصل أعلى تركيز له في السلالة 8 *A. flavus* sy (1782.9 ppb)، وهذه القيم أعلى من الحد المسموح به للاستهلاك البشري والحيواني في سورية حسب هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، وهو مؤشر خطير يوجب الحذر والانتباه إلى ضرورة إجراء مسح لجميع المنتجات والمحاصيل للكشف عن وجود التلوث بالسموم الفطرية والفطريات المفرزة لها.

كانت سلالات النوع *A. flavus* قادرة على إفراز الأفلاتوكسينات B₁ و B₂ فقط، ولم تُفرز الأفلاتوكسينات G₁ و G₂، وكانت نسبة السلالات المفرزة للأفلاتوكسينات من هذا النوع 80%. ويُمكننا استهداف المورثتين *afIR* و *omt-1* من تمييز السلالات المفرزة لسموم الأفلاتوكسينات عن السلالات غير المفرزة لها، ويُعد غياب المورثة حلاً دقيقاً عملياً لاختيار سلالة فطرية سليمة لا تفرز الأفلاتوكسينات، وتعد تقنية PCR طريقة سريعة بتكلفة قليلة نسبياً تسمح بالحيطة، وحساسية لكشف حالة التلوث بالأفلاتوكسينات، ويمكن اعتمادها لكشف السلالات المفرزة للأفلاتوكسينات.

المقترحات

يُوصى بالكشف عن مورثات أخرى مختلفة في مسار تركيب الأفلاتوكسينات، واستعمال طريقة النسخ العكسي Reverse Transcription (RT-PCR)، ودراسة الشروط المؤثرة في تعبير المورثات. وإجراء مسح لجميع المنتجات والمحاصيل للكشف عن وجود التلوث بسموم الأفلاتوكسينات والفطريات المفرزة لها. إضافة لإجراء بحوث حول استعمال السلالات الفطرية غير المفرزة للأفلاتوكسينات، والنتيجة عن هذه الدراسة في مكافحة الحيوية للفطريات، عن طريق استعمال المنافسة بين الفطريات، ومعرفة قدرتها على منع السلالات المفرزة للأفلاتوكسينات من إفراز السم وتلويث المحاصيل الغذائية.

المراجع

- الفيصلي، عبد الحسين. 1999. الهندسة الوراثية. دار الشروق للنشر والتوزيع، الطبعة العربية الأولى، 4-063-00-ISBN 9957، عمان، الأردن، 379 صفحة.
- عبيدو، علي ابراهيم ومحمود، أحمد عبد الفتاح. 2008. أساسيات التقنية الحيوية. مكتبة المعارف الحديثة بالإسكندرية - مصر، 315 صفحة.
- محمد سعد، محب الدين. 1991. السموم الفطرية، مشكلة زراعية، بيئية، صحية. الهيئة المصرية العامة للكتاب، القاهرة - مصر، 290 صفحة.
- وزارة الصناعة بالجمهورية العربية السورية. 2008. الحدود القصوى للسموم الفطرية المسموح بها في الأغذية والأعلاف - الأفلاتوكسينات - هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، مواصفة رقم 2680 قرار الاعتماد رقم 362 - سورية، ص 2-19.
- Abdulateef, S. M. 2014. Study of Genetic Diversity Among Some *Aspergillus flavus* Isolates by Using ISSR Marker and Nested PCR. A Thesis Submitted to the Council College of Science, University of Baghdad in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Mycology, Republic of Iraq, 90 pages.
- Al-Hmoud, N.; M.A. Ibrahim, H. Al-Rousan, and A. Aalseyah,. 2012. The Prevalence of Aflatoxinogenic *Aspergillus parasiticus* in Jordan. International Journal of Microbiology Volume 2012, Article ID 675361, 5 pages.
- Amadi, J. E. and D.O. Adeniyi. 2009. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. Nigeria, African Journal of Biotechnology Vol. 8 (7): 1219 - 1221.
- Barros, G. ; A. Torres, and S. Chulze. 2005. *Aspergillus flavus* population isolated from soil of Argentina's peanut-growing region. Sclerotia production and toxigenic profile. Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 85 (14): 2349- 2353.

- Criseo, G.; A. Bagnara, and G. Bisignano. 2001. Differentiation of aflatoxin-producing and non-producing strain of *Aspergillus flavus* group. Letters in Applied Microbiology, 33 (4): 291 - 295.
- Das, A.; S. Bhattacharya, M. Palaniswamy, and J. Angayarkanni. 2013. Molecular identification of *Aspergillus flavus* GHBF09 involved in aflatoxin B1 production in rice straw. Annals of Biological Research, 4 (6): 102 - 110.
- Degola, F.; E. Berni, C. Dall'Asta, E. Spotti, R. Marchelli, I. Ferrero and F.M. Restivo,. 2007. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Journal of Applied Microbiology, 103 (2007): 409- 417.
- Dela Maza, L.M.; M. T. Pezzlo and E. J. Baron. 1997. Color Atlas of Diagnostic Microbiology. Mosby-year Book, Inc - USA.
- Ehrlich, K.C. 2014. Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxins contamination in crops: advantages and limitations. Frontiers in Microbiology, Vol. 5, Article 50, 9p.
- El Khoury, A.; A. Atoui, T. Rizk, R. Lteif, M. Kallassy, and A. Lebrihi. 2011. Differentiation between *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* from Pure Culture and Aflatoxin-Contaminated Grapes Using PCR-RFLP Analysis of aflR-aflJ Intergenic Spacer. Journal of Food Science, Vol. 76 (4): 247 - 253.
- Erami, M.; S.J. Hashemi, S.A. Pournakhsh1, S. Shahsavandi1, S. Mohammadi, A.H. Shooshtari1 and Z. Jahanshiri. 2007. Application of PCR on detection of aflatoxinogenic fungi. Archives of Razi Institute, Vol. 62(2): 95- 100, Iran.
- FAO. 1992. Manual of food quality control. Microbiological analysis, Rome - Italy .
- FAO. 1993. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. Report of an FAO technical consultation R, 36- May 1993 - Italy.
- FAO.1994. Agricultural engineering in development, post-harvest operations and management of food grains. By M.de Lucia and D. Assenoto FAO consultants, Rome – Italy, 260p.
- FDA. 2002. Aflatoxins. US. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Food borne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 300p.
- Hajare, S. S.; S.N. Hajare and A. Sharma. 2006. Screening of Indian corn Varieties for Aflatoxin Resistance. Poster paper was awarded the first prize in the subject area "Infestation Control and Food Protectants", at the 17th Indian Convention of Food Scientists and Technologists (ICFOST 2005) held at NIMHANS, Bangalore, Founder's Day, no. 273: 218 - 230.
- Imtiaz, H. 2011. Aflatoxin Measurement and Analysis, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control, Dr Irineo Torres-Pacheco (Ed.), ISBN: 9786-711-307-953-, InTech, 364p.
- Ghaziaskar, H.S. and A. Sheibani. 2008. Pressurized Fluid Extraction for Quantitative Recovery of Aflatoxins B1 and B2 from Pistachio. Department of Chemistry, Isfahan University of Technology Isfahan, I.R. Iran, 841566 ,83111-p.
- Geisen, R. 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. Systematic and Applied Microbiology 19 (3) : 388 - 392.
- Kim, D.M.; N. Lee, S.M Kim, S.H. Chung, M. Kim, S.B. Han and H.S. Chun. 2013. Occurrence of aflatoxin and aflatoxigenic *Aspergillus species* in corn harvested in Korea. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, Vol. 56 (2) : 221 - 225.
- Lee, C.Z.; G.Y. Liou and G.F. Yuan. 2006. Comparison of the aflR gene sequences of strains in *Aspergillus* section Flavi. Microbiology 152 (2006): 161 - 170.
- Liu, B.H. and F.S. Chu. 1998. Regulation of aflR and Its Product, AflR, Associated with Aflatoxin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, October, 1998 Vol. 64 (10): 37183723-,
- Luo, J.; R.F. Vogel and L. Niessen. 2014. Rapid detection of aflatoxin producing fungi in food by real-time quantitative loop-mediated isothermal amplification. Food Microbiology, 44 (2014) :142 - 148.
- Mauro, A.; P.J. Cotty, P.J and P. Battilani. 2015. Aflatoxin biocontrol, an interesting experience for Europe and the Mediterranean basin. in 14th Congress of the Mediterranean Phytopathological Union and International Society of Mycotoxicology (Mediterranean Branch) meeting, Istanbul, Turkey, Phytopathologia

- Mediterranea (2015) 54, 1:140 - 196.
- Mayer, Z.; P. Färber and R. Geisen. 2003. Monitoring the Production of Aflatoxin B1 In Wheat by Measuring the Concentration of nor-1 mRNA. Appl Environ Microbiol. February; 69(2): pp.1154 - 1158. Copyright © 2003, American Society for Microbiology.
 - Medina, A.; A. Rodriguez and N. Magan. 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxins B1 production. Frontiers in Microbiology, July 2014, Vol. 5, Article 348, 7p.
 - Mngadi, PH.T. 2007. Molecular Characterization of Aflatoxigenic and Non-Aflatoxigenic *Aspergillus* Isolates. Masters thesis in Technology in the Department of Biotechnology & Food Technology, Faculty of Engineering, Science and the Built Environment, Durban University of Technology, South Africa, 102p.
 - Navya H. M.; P. Hariprasad, J. Naveen, S. Chandranayaka and S.R. Niranjana. 2013. Natural occurrence of aflatoxin, aflatoxigenic and non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* in groundnut seeds across India. African Journal of Biotechnology, 12(19): 2587 - 2597.
 - Probst, C.; R.P. Bandyopadhyay and J. Cotty. 2014. Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. International Journal of Food Microbiology 174 (2014): 113 - 122.
 - Probst, C. 2011. Fungi Associated With Aflatoxin Contamination In Africa. A Dissertation submitted to the faculty of the school of plant sciences in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy with a major in plant pathology in the graduate college, The University of Arizona, 190 p.
 - Qazi, J.I. and Z. Fayyaz. 2006. Aflatoxin contaminated foods and health risk perspective for Pakistani population. Environmental Microbiology Laboratory, Department of Zoology, University of the Punjab Lahore. Mycopath (2006), 4(2): 27 - 34.
 - Rahimi, P.; B. Sharifnabi and M. Bahar. 2006. Detection of Aflatoxin in *Aspergillus* Species Isolated from Pistachio in Iran. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan - Iran, 18p.
 - Rashid, M.; S halil, N. Ayub, W. Ahmed and A. Khan. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus Parasiticus* Isolates of Stored wheat Grains in to Aflatoxinogenics and Non-Aflatoxinogenics. Pak. J. Bot., 40(5): 2177 - 2192.
 - Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1977. The Genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger publ. Co. Huntington, library of congress catalog card number 6521117-, New York-USA.
 - Reddy, K. R. N.; Ch. Surendhar Reddy, P. Nataraj Kumar, C.S. Reddy and K. Muralidharan,. 2009. Genetic variability of aflatoxin B1 producing *Aspergillus flavus* strains isolated from discolored rice grains. World J Microbiol Biotechnol 25: 33 - 39.
 - Reddy, K.R.N.; N.I. Farhana, A.R. Wardah and B.Salleh. 2010. Morphological Identification of Food borne Pathogens Colonizing Rice Grains in Asia. Malaysia, Pakistan Journal of Biological Sciences 13 (16): 794 - 801.
 - Salaman, Z.A.; H.W.Abdulmalek, N.J. Al-judy, B.I. Dheeb, Sh.A. Al Abbasi, H.R. Hussein, S.M. Abdulateef and W. Al bassam. 2015. Detection the ability of *Aspergillus parasiticus* local Iraqi isolates for aflatoxin B1 production. Current Research in Microbiology and Biotechnology, Vol. 3 (1) (2015): 564568-.
 - Shweta, S., S. Madhavan, V. Paranidharan and R. Velazhahan. 2013. Detection of *Aspergillus flavus* in maize kernels by conventional and real-time PCR assays. International Food Research Journal 20(6): 3329 - 3335.
 - Trail, F.; N. Mahanti and J. Linz. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. Microbiology 141: 755 - 765 (Cited by Mngadi, 2007).
 - Younis, Y.M.H. and K.M. Malik. 2003. TLC and HPLC Assays of Aflatoxin Contamination in Sudanese Peanuts and Peanut Products. Kuwait J. Eng. 30(1): 79 - 94.
 - Yu, J.; P.K. Chang, K.C. Ehrlich, J.W. Cary, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland, G.A. Payne, J.E. Linz, C.P. Woloshuk and J. Bennett. 2004. Clustered Pathway Genes in Aflatoxin Biosynthesis. Applied and Environmental Microbiology, 70 (3) :1253 - 1262.

N° Ref: 755