Morphology and molecular by RT-PCR Identification of local isolate fungi *Penicillium chrysogenum* .

التشخيص المظهري والجزيئي بتقانة متعدد البوليمريز المتسلسل نوع الحقيقي (RT-PCR) لعزلة محلية للفطر*Penicillium chrysogenum*.

م. بان موسى حسن الزبيدي * أ.د.سامي عبد الرضا الجميلي أ.د.بان طه محمد
جامعة كربلاء / كلية التربية للعلوم الصرفة

*البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

الخلاصة

عزل محليا" الفطر *Penicillium* المنتج للمضاد الحيوي البنسلين Penicillin وشخص بالأعتماد على المواصفات المظهرية Morphological Characteristics والخصائص المجهرية Microscopic Chracteristics وبأستخدام الاوساط الزرعية التالية YEA , CZA , PDA لمعرفة النوع ولتأكيد التشخيص أستخدمت التقانة الجزيئية RT- PCR أظهرت نتائج التشخيص المظهرية والجزيئية أن العزلة تعود للفطر *Penicillium chrysogenum* .

Abstract

We can be isolated alocal fungus was *Penicillium* , the morphological diagnosis by used PDA ,CZA , YEA and molecular diagnosis by RT-PCR results proved that the isolate was belonging to the fungus *P.chrysogenum*.

المقدمة

أطلق العالم Link اسم *penicillium* لأول مرة عام 1809 م في كتاب تضمن مجموعة من الفطريات التي تكون Penicillus وهي كلمة لاتينية تعني فرشاة الصباغ أو الرسام وصف في هذا الكتاب ثلاثة أنواع للجنس *Penicillium* هي *P.expansum* ,*P.candidum* , *P.glaucum* والنوع *expansum* المعروف بأنه المسبب لمرض تعفن التفاح Rot of apple أعتبر مثالا" نموذجيا" للجنس (1) .

تمتاز مستعمرات الفطر *Penicillium* بكونها سريعة النمو ،مسطحة الشكل كثيفة ،خيطية ذات تركيب مخملي صوفي أو قطني تكون في بداية النمو ذات لون ابيض ثم مع الوقت تصبح خضراء مزرقة ،خضراء رمادية أو زيتونية رمادية وأحيانا" صفراء أو وردية أما خلفية المستعمرات عادة تكون شاحبة أومصفرة وقد تكون في بعض الأنواع حمراء او بنية (2) .

يتركب الفطر *Penicillium* من هايفات متفرعة عديمة اللون, مقسمة بجدر عرضية تنمو الهايفات لتعطي حوامل بوغية مقسمة متفرعة في نهاياتها الى عدة أفرع قصيرة تحمل في أطرافها الجراثيم الكونيدية بهيئة سلاسل , الابواغ كروية أو كمثرية الشكل ناعمة أو خشنة ، تنشأ الكونيديا Conidia من تراكيب متخصصة تدعى القوارير Phialides التي بدورها قد تنتج مفردة أو تتفرع من تراكيب أخرى تدعى متيولات Metulae و بذلك يظهر الشكل العام للحامل البوغي Conidiaphore مع الكونيديا Conidia بشكل المكنسة أو الفرشاة ومنها أشتق الأسم اللاتيني *Penicillium* الذي يعني فرشاة الصباغ Painter's brush (3).

يعد الفطر *P. chrysogenum* شائع في المناطق المعتدلة وشبه الأستوائية كما يمكن تواجده في المنتجات الغذائية المالحة , وغالبا" في البيئات المغلقة وخاصة الرطبة منها كان يعرف سابقا" بالنوع *P.notatum* (4).

يستخدم الفطر *P. chrysogenum* بشكل واسع في الصناعة وفي معاملة بعض المخلفات النباتية المطحونة وانتاج بعض الأنزيمات مثل Polyamine oxidase , Phospho-gluconate dehydrogenase كما عرف بقدرته العالية على انتاج المضاد الحيوي البنسلين penicillin , سجل تواجد النوع *P.chrysogenum* بشكل شائع في البيئة وخصوصا" التربة في عدد كبيرمن الدول منها فنلندا , السويد , بولندا , جيكوسلوفاكيا , اميركا , ايطاليا , اسبانيا , فرنسا , تركيا , ساحل العاج , افريقيا الوسطى , افريقيا الجنوبية , الصين , اليابان , الهند , البهاما , البرازيل و بيرو (5).

وعلى الرغم من أنه ليست كل سلالات الفطر *P. chrysogenum* منتجة للبنسلين Penicillin الا أنه أول سلالة أنتجت البنسلين كانت عن طريق هذا العفن , يتواجد هذا العفن بشكل كبير في البيئة حيث تمثل التربة أهم مصادر عزله , كما يمكن عزله من العديد من المواد الغذائية كالحمضيات والحبوب , ويعتبر الهواء أحد المصادر المهمة للحصول عليه (6).

سلطنا الضوء في هذه الدراسة على احد عزلات الفطر *Penicillium* والتي أثبتت كفاءتها في انتاج المضادات الحياتية من أجل معرفة التشخيص الدقيق لها لأهميتها في المجال الطبي فأستخدمت تقانة RT- PCR لتأكيد التشخيص المورفولجي .

المواد وطرائق العمل

أولا": المواد

1.الأوساط الزرعية Culture media

a.الأوساط الزرعية الجاهزة Ready – made media

1. آكار – البطاطا دكستروز Potato – Dextrose Agar (PDA)

2.آكار خلاصة الخميرة Yeast Extract Agar (YEA)

حضرت الأوساط الزرعية الجاهزة الواردة في أعلاه كلا" بحسب تعليمات الشركة المنتجة Indian / Hemedia والمثبتة على العبوة .

b.الأوساط الزرعية المحضرة Prepared media

- وسط آكار الزابك Czapex Agar (CZA) تضمن الوسط المواد التالية :-

- **$FeSO_4 .7H_2O$ 0.01g , $NaNO_3$ 3g , K_2HPO_4 1g , KCl 0.5g , $MgSO_4 .7H_2O$ 0.5 g**
- **Agar 15g , Sucrose 30g .**

تم أذابة المكونات أعلاه في 1000 مل من الماء المقطر (7) .

ملاحظة: عقمت جميع الأوساط الزرعية بالمؤصدة Autoclave بدرجة حرارة 121 مº تحت ضغط 15 باوند / انج^2 لمدة 20 – 15 دقيقة , تركت الأوساط بعد التعقيم لتبريدها إلى درجة 45 مْ ثم أضيف المضاد الحيوي الكلورومفنيكول Chloramphenicol لتثبيط نمو البكتريا.

2.المواد المستخدمة في تقنية PCR PCR materials

a.عدة أستخلاص DNA DNA Extraction Kit

تضمن المواد التالية :-

ت	المادة Material	الشركة المصنعة Manufactor company	المنشأ State
1	Proteinase K enzyme	Progma	USA
2	Cell lysis solution		
3	Nucleic lysis solution		
4	RNase solution		
5	Protein removal Buffer		
6	TE buffer	تحضير مختبري	
7	2 – Isopropanol	BDH	England
8	Ethanol % 70	Fluka	Switzerland

b.عدة فحص Real-Time PCR

تضمن المواد التالية :-

ت	المادة Material	المكونات Contains	الشركة المصنعة Manufactor company والمنشأ State
1	- AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix	2X Syber green dye qPCR master mix	Bioneer (Korea)
2		DEPC water	

c.البوادئ Primers

صممت البوادىء لجين Internal transcribed spacer1 (ITS1)gene الخاص بتشخيص الفطر *Penicillium chrysogenum* وذلك من خلال استخدام التسلسل الكامل للجين (EF200101.1 ITS1 Whole gene sequence)من موقع بنك الجينات Genebank-NCBI وباستخدام برنامج Primer3plus لتصميم البادئات والخاصة في فحص التقانة Real-Time PCR, جهزت البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية .

(Primerالبادىء)	(Sequenceالتسلسل الجيني)		PCR product size(حجم نواتج PCR)
ITS1	F	ACGGGTGAAACAGGATGATCC	111bp
	R	ACAGAGTTCGAGGGTGTCTTC	

ثانيا": طرائق العمل

1.التشخيص المظهري Morphological Identification

شخصت عزلة الفطر *P. chrysogenum* حسب مواصفاتها المظهرية والخصائص المجهرية لمعرفة النوع Species بعد زراعة العزلة على الأوساط التالية: PDA و CZA و YEA وبأستخدام المفاتيح التصنيفية :(10; 9 ; 8).

2.التشخيص الجزيئي Molecular Identification

تم أجراء فحص Real-Time PCR لتشخيص الفطر *P. chrysogenum* في جامعة الديوانية / كلية الطب البيطري/ وحدة الامراض المشتركة.وذلك باستخدام البادئات الخاصة بالمنطقة الجينية ITS1 الخاصة لتشخيص الفطر حسب طريقة (11),وكما يأتي :

أولا": أستخلاص وتنقية DNA DNA extraction and purification

1.أخذت عينات ملء Loop من مستعمرات الفطر النامية لمدة 7 أيام على وسط PDA وبدرجة حرارة 25 م° نقلت العينات إلى Eppendorf tubes معقمة سعة 1.5 مل , أغلقت بشكل محكم بواسطة شريط Parafilm وغطست في قنينة النايتروجين السائل Liquid nitrogen لمدة 7 دقائق . بعد أخراج العينة سحقت بإستخدام أعواد خشبية Wooden stick لمدة لا تقل عن 5 دقائق .

2.أضيف 600 µl من Cell lysis solution مع 60 µl من الأنزيم Proteinase K مزجت العينة بالمازج Vortex لمدة 10 ثواني مع مراعاة رج العينة بين الحين والآخر أثناء مدة الحضن , حضنت العينات بدرجة حرارة 55 م° لمدة ليلة كاملة Overnight .

3.نبذت العينة في جهاز الطرد المركزي Centrifuge بسرعة 14000 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين ثم أزيل الرائق .

4. أضيف 300µl من محلول تحليل الأنوية Nucleic lysis solution الى الر اسب وحركت العينات بلطف لغرض المزج.

5. أضيف 1.5µl من RNase ومزجت العينات بواسطة Vortex لمدة 10 ثواني ثم حضنت العينات بدرجة 37 م° لمدة 15 دقيقة لتحليل RNA .

6. حضنت العينات في الثلج لمدة 5 دقائق ثم أضيف 100µl من الدارئ Protein Removal Buffer مزج المحلول بـ Vortex لمدة 10 ثواني .

7. نبذت الأنابيب بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق , نقل الرائق بلطف إلى Eppendorf tube معقمة سعة 1.5 مل .

8.أضيف للرائق 300µl من الايزوبروبانول Isopropanol ومزجت جيداً بالتقليب لعدة مرات بلطف حتى ظهور خيوط DNA .

9.نبذت الأنابيب بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .

10.أزيل الرائق بلطف وأضيف للراسب 300µl من الايثانول 70 % قلبت العينات عدة مرات لغسل DNA المتمركز على جدران الأنبوبة ثم رجت الأنابيب لغسل DNA.

11.نبذت الأنابيب مرة أخرى بسرعة 15000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق .

12.أزيل الرائق وقلبت الأنابيب على ورق نشاف لمدة 10 دقائق للتخلص من الايثانول .

13.أضيف 100µl من محلول TE buffer وحضنت العينة تحت درجة حرارة 60 م° في حمام مائي لمدة 30 – 60 دقيقة حركت العينة أثناء الحضن عدة مرات حتى تصبح رائقة .

14.حفظت الأنابيب بدرجة (20-) م° في المجمدة لحين الأستعمال.

ثانيا": فحص الحمض النووي المستخلص DNA profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer (THERMO. USA) الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووي (DNA)حيث يتم الكشف عن الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA (ng\µl) وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين (260-280nm) وتم استخدام الجهاز على النحو التالي :

1. شغل جهاز Nanodrop ثم أنتخب من قائمة الخيارات برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .
2. صفر الجهاز مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من (ddH_2O) باستخدام ماصة دقيقة معقمة على سطح ركيزة المقياس وبعدها قمنا بتنظيف الركيزة لقياس العينات.
3. ضغط على زر OK لبدء عملية قياس تركيز الحامض النووي DNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من الدنا DNA المستخلص ثم نظفت ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى وهكذا.
4. حددت نقاوة عينات الدنا DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية بجهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

ثالثا": تحضير مزيج Real- time PCR master mix

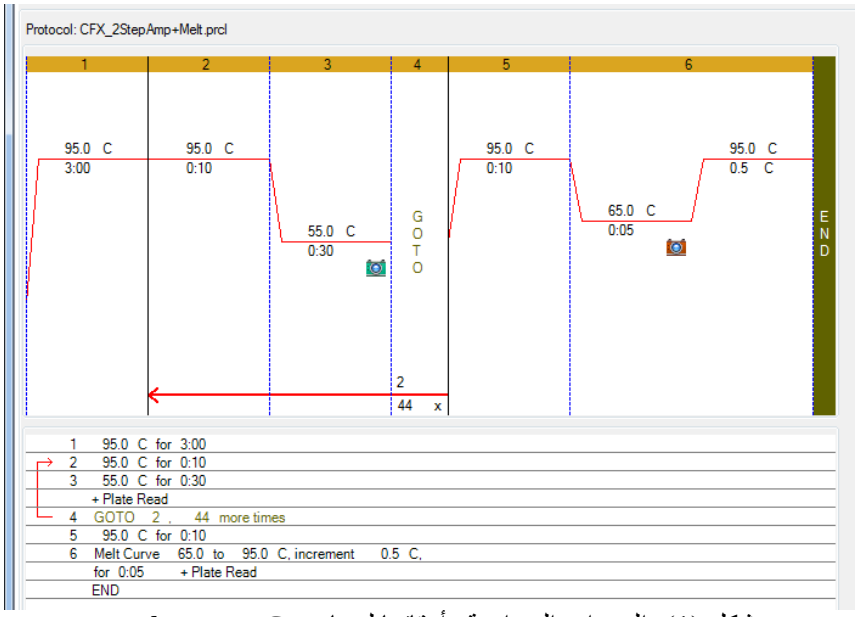
حضر مزيج تفاعل Real-Time PCR باستخدام عدة ال AccuPower® 2X GreenStar^{TM} qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة ال Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة وكالاتي:

PCR master mix(مزيج تفاعل PCR)	Volume(حجم)
2X Green star master mix	25 µL
DNA template	5µL
ITS1 forward primer (10pmol)	1µL
ITS1 reverse primer (10pmol)	1µL
DEPC water	18µL
Total	50µL

ثم وضعت مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول اعلاه الى أنابيب بيضاء معقمة حجم 0.2ml خاصة بالجهاز Real-Time PCR , ثم نقلت جميع الانابيب الى جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق ومن ثم وضعت في جهاز Real-Time PCR .

رابعا": حالات الدورات الحرارية لفحص Real-Time PCR Thermocycler conditions

طبقت الدورات الحرارية لفحص Real-Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات عدة المزج AccuPower® 2X GreenStar^{TM} qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة حرارة البادئات (Tm) وذلك باستخدام الجهاز MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA كما في الشكل ادنى:



شكل (1): الدورات الحرارية وأوقاتها لجهاز Real-Time PCR

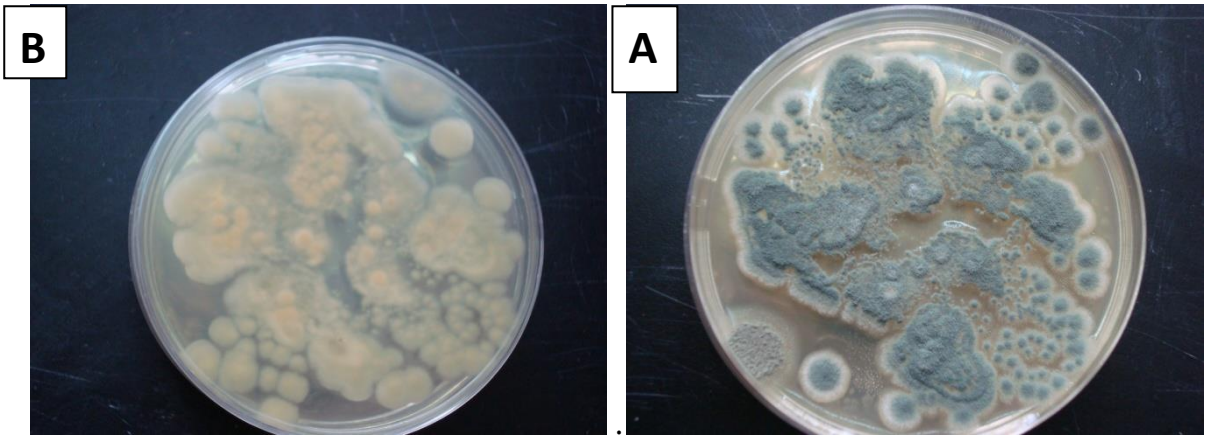
خامسا":تحليل نتائج فحص Real-Time PCR

حللت نتائج فحص Real-Time PCR من خلال منحى التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبه Threshold cycler number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة وكذلك تم تحديد خصوصية الفحص للعينات الموجبة من خلال منحنى الانصهار Melt peak حيث تكون العينات موجبة اذا كان ظهورها في نفس درجة الانصهار والتي تتراوح في التضخم الحقيقي للجين من Tm 80-90 °C.

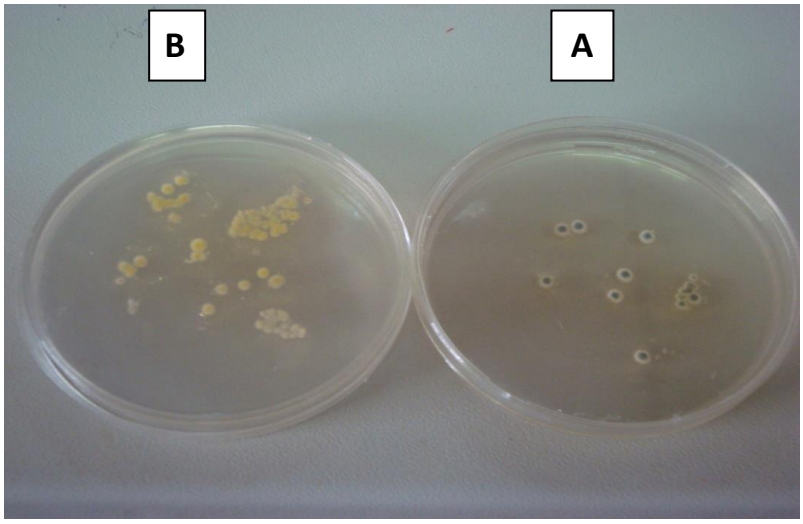
النتائج والمناقشة Result and Discussion

1.التشخيص المظهري Morphological Identification .

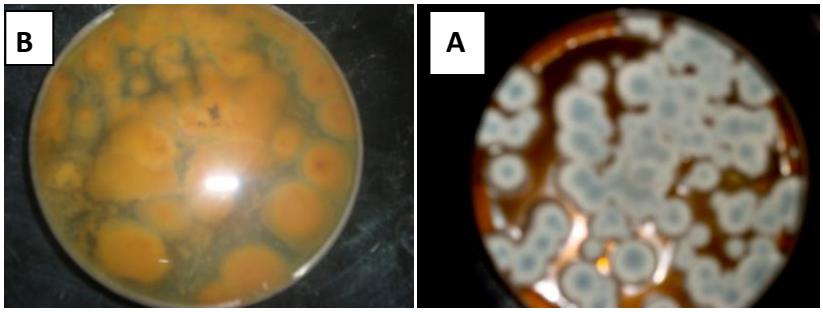
شخصت عزلة الفطر *Penicillium* المنتخبة حسب مواصفاتها المظهرية Morphological characteristics والخصائص المجهرية Microscopic chracteristics عند زراعتها على الاوساط PDA و CZA و YEA اذ أعطت العزلة على الأوساط الثلاثة شكلا" مخمليا" , بحافات بيضاء تحيط بالمستعمرة مع ظهور هالة من صبغة صفراء شفافة Yellow Pigment حول المستعمرة على الوسطين PDA و CZA (الشكل2 و 3) على التوالي أما السطح السفلي للمستعمرات فكان ذو لون أصفر ساطع تتباين درجة اللون الأصفر حسب نوع الوسط , أما لون المستعمرة الفطرية فكانت ذات لون أخضر مزرق على وسطيٌ PDA و CZA تميل الى اللون الأخضر الرمادي على وسط YEA (الشكل 4) الأبواغ اللاجنسية conidia كروية أو شبه كروية , ملساء , الحامل الكونيدي conidiaphore أملس غير منتظم ثنائي التفرع (الشكل5) , المواصفات الواردة في أعلاه تنطبق على نوع الفطر *P.chrysogenum* بحسب المفاتيح التصنيفية: (9;10).



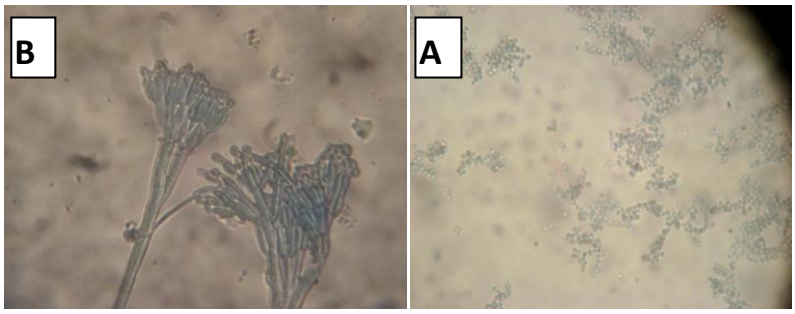
شكل (2) شكل ولون مستعمرات عزلة الفطر *P. Chrysogenum* على وسط P.D.A
A:السطح العلوي للمستعمرة B :السطح السفلي للمستعمرة (ظهر الطبق)



شكل (3) شكل ولون مستعمرات عزلة الفطر *P. chrysogenum* على وسط Czabex
A :السطح العلوي للمستعمرة B :السطح السفلي للمستعمرة (ظهر الطبق)



شكل (4) شكل ولون مستعمرة الفطر *P. chrysogenum* على وسط Yeast Extract
A :السطح العلوي للمستعمرة B :السطح السفلي للمستعمرة (ظهر الطبق)



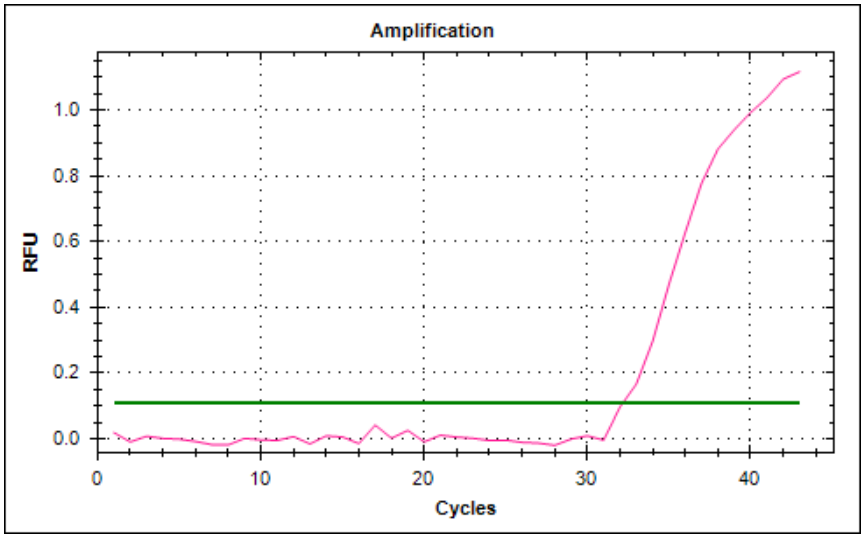
شكل (5) شكل الحامل البوغي والفرشاة مع شكل الأبواغ اللاجنسية لعزلة الفطر*P.chrysogenum*.
A : شكل الأبواغ اللاجنسية Conidia للعزلة المنتخبة للفطر *P.chrysogenum*
B : شكل الحامل الكونيدي والفرشاة للعزلة المنتخبة للفطر *P. chrysogenum*

2.التشخيص الجزيئي للعزلة المنتخبة للفطر *P. chrysogenum*.

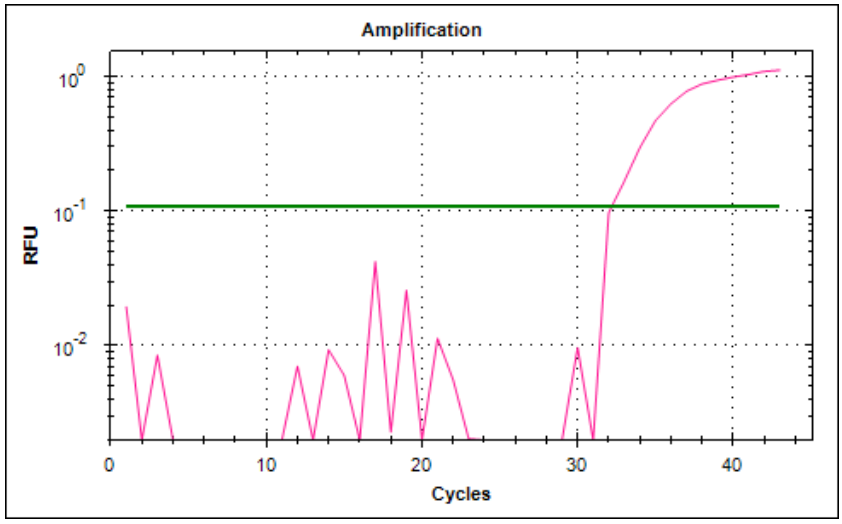
بينت نتائج أستخلاص DNA وبعد الفحص في جهاز nanodrop أن العينات أحتوت على DNA بتركيز 65.3ng/ml وبنقاوة عالية بلغت 1.84nm .

التشخيص بتقانة Real –time PCR

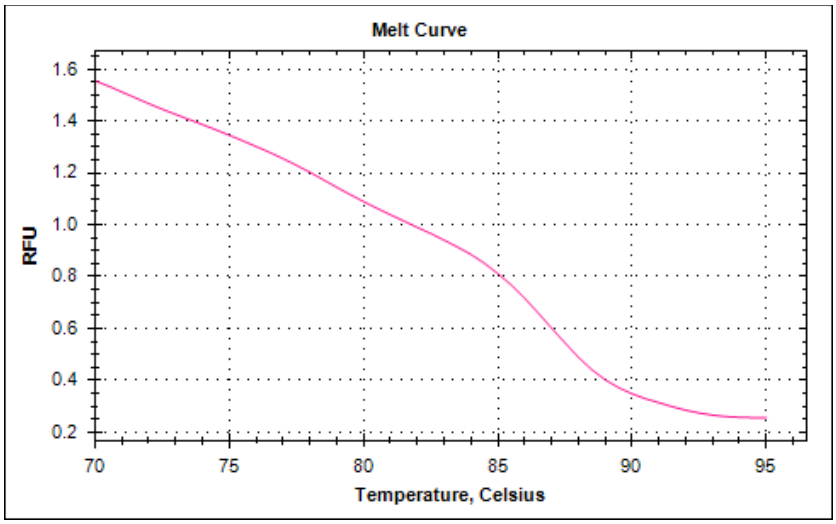
أظهر التشخيص الدقيق بتقانة RT-PCR للدناDNA المستخلص من عزلة الفطر *P. chrysogenum* نتيجة موجبة وكما موضح في الأشكال (6), (7), (8), (9) .



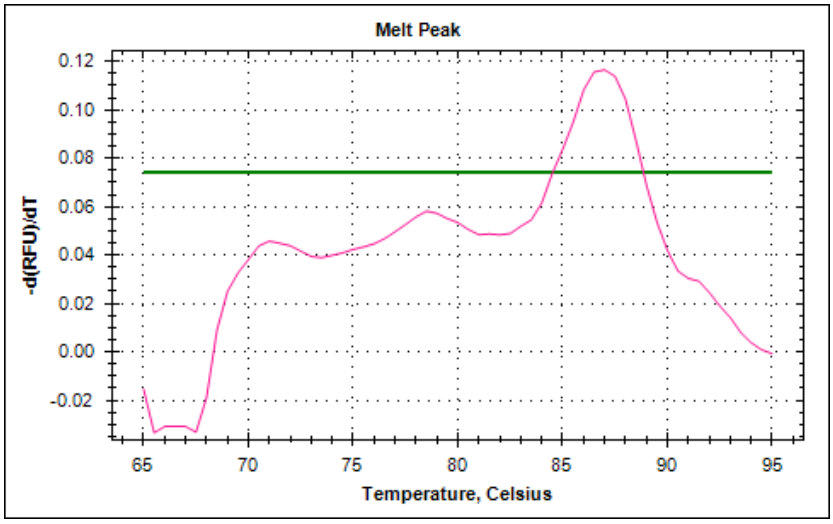
شكل (6): منحنى التضخم Amplification plot للعينة الموجبة لفطر *P. chrysogenum* في فحص RT- PCR



شكل (7): منحنى التضخم اللوغارتمي Amplification log plot للعينة الموجبة لفطر *P. chrysogenum* في فحص RT- PCR



شكل (8): منحنى الانصهار Melt curve للعينة الموجبة لفطر *P. chrysogenum* في فحص RT- PCR



شكل (9): منحنى درجة الانصهار Melt peak بدرجة حرارة (87°C) للعينة الموجبة لفطر *P. chrysogenum* في فحص RT- PCR

المصادر:

1-Orpurt ,P.A. and Fennell ,D.I. (1955) Anew species of penicillium from soil .Mycologia , 47: 233-237.

2-Larone,D.H.(1995).Medically Important Fungi - A Guide to Identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.

3-Hoog, G.S .; Guarro,J.;Gene, J.; Figueras,F.(2000)Atlas of clinical fungi. 2nd Edition.(Ultrecht).

4-Anderson,B.; Frisvad,J,C.; Sondergard,I.; Rasmussen,I,S.; and Larsen ,L,S . (2011) Association between fungal species and water damaged building.

5-Domsch ,K . H.; Gams, W .; and Anderson ,Traute-Heidi. (1980) Compendium of soil fungi .Vol.I and II.Academic press. .PP : 941.

6-Dayalan ,A .J.;Darwen ,P.; Prakash, S .(2011) Comparative study on production , purification of penicillin by *penicillium* isolated from soil and citrus sample . Asian pacific J of tropical biomedicine .10:1016-2221.

7-Eaton ,A.D.; Clesceri ,L.S.; and Greenberg ,A.E.(1998) Standard method for the examination of water and waste water , 20th Ed .,American public health association Washington ,D.C.

8-Cobus ,M,Visagie .(2008)Biodiversity in the genus *Penicillium* from coastel fynbos soil .Thesis presented in partial fulfillment of the requirement from the degree of master of science at Stellenbosch university.

9-Moubasher ,A.H.(1993)Soil fungi in Qatar and other arab countries .Doha ,university of Qatar ,center of scientific and applied research .First published.

10-Nell,J.C.(1936)The mould fungi of new Zealand.The genus *Penicillium*. Plant diseases divition,Plant research burean, Palmerston North.

11- Lignell ,U.; Meklin, T.; Rintala, H.; Hyvärinen, A.; Vepsäläinen ,A.; Pekkanen, J .; Nevalainen, A.(2010) Evaluation of quantitative PCR and culture methods for detection of house dust fungi and streptomycetes in relation to moisture damage of the house. National Public Health Institute, Department of Environmental Health, Kuopio, Finland. ulla.lignell@ssm.fi