التوصيف الوظيفي والجزيئي لبعض أنواع الفطر *Geotrichum* sp

الخلاصة Summary

تناولت هذه الدراسة توصيف لبعض أنواع الفطر ***Geotrichum* spp** المعزول من ثمار الطماطة والمعجون المستورد من مناشئ مختلفة وشمل هذا التوصيف الأعراض التي تسببها هذه العزلات في ثمار ومعجون الطماطة وكذلك الصفات المظهرية والمجهريه والكيموحيوية والوراثية لهذه العزلات.

بينت نتائج العزل والتشخيص وبالأعتماد على الصفات المظهرية والمجهرية والأختبارات البايوكيمياوية وجود نوعين من الأنواع التابعة للجنس ***Geotrichum* spp** هما الفطر ***G.candidum*** وبواقع 12 عزلة والفطر ***G.penicillatum*** بواقع 8 عزلات.وأكدت نتائج طريقة الـPCR Multiplex أن العزلتين اللتين تم أختبارهما لدراسة تأثيراتهما بأن أحدهما تعود للفطر ***G.candidum*** أذ أحتوى حامضها النووي (DNA)على جين ***SE1*** الشائع الوجود في الفطر ***G.candidum*** في حين أحتوت العزلة الثانية على جين ***SE2*** في حامضها النووي وهو شائع الوجود في فطر ***G.penicillatum***، بالأضافة الى أحتواء العزلتين على جين **Lipase** الذي يعد صفة سائدة في جميع الأنواع التابعة للجنس ***Geotrichum*** .

المقـــــدمة Introduction

يواجه المختصون صعوبة كبيرة في تصنيف الفطر *Geotrichum* نتيجة للتغاير الواسع الذي يحصل في الصفات الشكلية والفسلجية لهذا الفطر.وسابقا واعتمادا على بعض الخصائص التصنيفية والاختبارات البايوكيمياوية فقد صنف الفطرعلى انه من الخمائرالكيسية ascomycetes –like-yeast واعطي هذا الفطراسماء متعددة منها *Oidium lactis,Oospore lactis, Oidium nubilum,Oidium shumi* , (Dziuba.,1989). ولكن ذكر Esser &Lemke(١٩٩٦) ان هناك طور مشابه (Telomorphus) للفطر *Geotrichum* يدعى *Galactomyce geotrichum* اما المعلومات المستنتجة من الدراسات الوراثية فتشير الى ان الجنس*Galactomyces* يظم ستة انواع من اهما هو النوع *G.geotricum* وليس له أي شكل مماثل anamorphus form

والنـوع الاخـر هـو *G.candidum* ولـه طـور مماثـل هـو *Geotrichum candidum* (DeHoog&Simth,2004).

وحديثا وتبعا للدراسات الوراثية والاختبارات البايوكيماوية وجد ان الفطر *Geotrichum* يظم ٨٨ نـوع أكثرهـا شـيوعا هـي *G.candidum* و *G.penicillatum* و *G.capitatum* و *G. klebahnli* و *G.galabrata*. *G.lypolyticum* ويعـــود للفطريـــات الناقصـــة Imperfect fungi وحسب الموقع التصنيفي ادناه :

Phylum: **Deuteromycota**

Form class: Hyphomycetes

Form order: Moniliales

Form family: Moniliaceae

Genus: Geotrichum

يعد الفطر *Geotrichum* النموذج المثالي للفطريات ثنائية الاشكال Dimorphic (fungi)اذ يتباين شكل الفطر بين الخميرة والغزل الفطري،وتبعا للتغاير المظهري الواسع لهذا الفطر فقد تميز ثلاثة اشكال متباينة منه وهي :الشكل الاول يكون مشابه للخمائر يتكاثر بتكوين السبورات المفصلية المتموجة (abundant arthrospoers) وتكون قابليته على تحليل البروتين واطئة جدا اما الشكل الثاني فيكون مشابها للفطريات الخيطية ذات هايفات مقسمة بيضاء اللون يتكاثربتكوين الكونيدات المفصلية (arthroconidid) وله فعالية عالية علـــى تحليـــل البـــروتين ،وبالنسبةللشـــكل الثالـــث فانـــه يتبـــاين بـــين الشـــكلين الســـابقين (Gueguen &Schmidt,1992).

تمتاز مستعمرات الفطر النامية على وسط السابرويد دكستروز اكار Saubrouds (dextrose agar) بأنها مسطحة بيضاء او بنية اللون ،ذات غزل فطري شفاف مقسم ذات

خلايا رقيقة الجدران احادية النواة غير منتج للصبغات ،اما الكونيدات المفصلية التي ينتجها الفطر فتكون مستطيلة –كروية الشكل احادية الخلية ،شفافة وناعمة الملمس ذات ابعاد(٣-٦ x) (٦-١٢) نانوميتر،تنتج هذه الكونيدات بعملية التجزء المتماثل للخيط الفطري غير المتمايز وغالبا ماتتبرعم هذه الكونيدات من احدى نهاياتها معطية تركيبا يشبه البرعم (bud-like) والذي ينمو فيمابعد مكونا الغزل الفطري ويمر هذا الفطر ايضا بتعايرات فسلجية متنوعة بحيث يصعب تصنيفه حتى في الاختبارات البايوكيمياوية (David,2008)

٣.٣. اهمية الفطر *Geotrichum*

٣.٣ .١الامراضية Pathogenicity

تعد التربة الموطن الاصلي لهذا الفطر،وهو من الفطريات الانتهازية والمحبة للكيراتين (Oppertunistic-Keratinophilic ungi)كما يتواجد في الماء والهواء ويصيب المحاصيل الزرعية ومنها الفواكه والخضر وخاصة الليمون والطماطة مسببا مرض التعفن الطري (Sour rot disease) ،اذ يساعد PH المنخفض والمحتوى الرطوبي العالي لهذه المحاصيل على استيطانها من قبل الفطر *G.candidum* ومن ثم تلفها و ينتج هذا الفطر مع فطريات اخرى مثل *Alternaria sp* منتجات ايضية تعمل على تغير الPH من الحامضي الى القاعدي مهيئا الفرصة امام البكتريا للنمو وتلف المحاصيل كما ان هذه الظروف تعد ملائمة لنمو الفطر *Geotrichum candidum* الذي يمتلك فعالية عالية لانزيم (Pectinogalactouraniase) الذي يعمل على تحليل الجدار الخلوي للنبات بالاضافة الى انزيمي (Lipase)و(Protease).(Wade et al.,2008)

لاتقتصر اصابة *G.candidum* للنبات وانما له اقابلية على اصابة كل من الانسان والحيوان.وعلى الرغم من ان هذا الفطر يعتبر من المستوطنات الطبيعية للانسان اذ تم عزله من البراز والادرار وافرازات المهبل والقشع الا انه يعد من الفطريات الانتهازية الخطرة اذا ماحدث أي خلل في الدفاعات المناعية للجسم **(Rippon *et al*,1982)** اذ يؤدي الى حدوث حالة(Geotrichosis).والتي تحدث في الفم والقصبات والجلد والامعاء ولكنها اخطرها تلك التي تحدث في الرئة (Pulmonary geotrichosis) كما ان لهذا الفطر القابلية على اختراق جهاز الدوران مسببا التعفن الدموي الفطري (Fungal septicemia)او (Fungemia) وهي من الحالات المرضية الخطرة التي تؤدي الى الوفاة مالم تعالج. ومن الملفت للانتباه ان لهذا الفطر مقاومة عالية للمضادات الفطرية المستخدمة في المعالجة فقد وجد Kimura(2001) ان هذا الفطر ابدى مقاومة لكل من مضادات AmphotercinB وFluconazole وKetoconazole بنسبة(75 %)،(80%)،(86 %) على التوالي ويزداد الامر خطورة عند المرضى ضعيفي المناعة (Immunocompromised patients)اذ ينصح بعدم استخدام المضادات الفطرية اطلاقا لمعالجتهم لكونها تعمل على تراكيب الكائنات حقيقة النواة (Bendove and Ashe,1999).

اما في الحيوان فذكر ان هذا الفطر هو المسبب الرئيسي لحالة التهاب الثدي(Bovine masititis) في الابقار نتيجة طبيعة معيشة هذه الحيوانات وتماسها مع التربة التي تعد الموطن الرئيس لهذا الفطر وان وجود أي خدش او جرح في الثدي يؤدي الى دخول الفطر الى الغدة اللبنية (Mammary gland) مسببا حالة الالتهاب،كما انه يسبب حالة الفطار الجهازي (Systematic mycosis) في القطط والكلاب ،كما عزل من حالات التهاب المشيمة (Placenta inflammation) في الاغنام.(Rajesh et al.,2001).

٣ .٣ .٢ .الاهمية الاقتصادية

يعد فطر *G.candidum* من الفطريات الشائعة في الاجبان اثناء عملية انضاجها (Chesse rippining) اذ استغل هذا الفطر صناعيا لتحسين نوعية الاجبان واعطاؤها نكهة مميزة في كثير من بلدان العالم ويعود ذلك الى قابليته العالية على انتاج انزيم اللايبيز(Lipase) وينتج هذا الفطر شكلين من هذا الانزيم هما (Lipase I)) و(Lipase II) وقد استغل انزيم هذا الفطر في تطبيقات التقنيات الحياتية في عملية كلونة الجينات اذ غالبا مايستخلص جين هذا الانزيم ويكلون في كائنات اخرى لزيادق قابليتها على انتاج الانزيم المحلل للدهون) ،بالاضافة الى انزيم (Protase).(Holmquist,1998) ويعمل هذان الانزيمان على تحرير الاحماض الدهنية والببتيدات والتي تمثل من قبل الاحياء المجهرية الموجودة في الاجبان وتحول الى مركبات منكهة ومحسنة للأنتاج(Bertolini et al.,1995).

كما يعمل الفطر *G.candidum* على معادلة PH للبن الخام وذلك من خلال تمثيل حامض اللاكتيك (Lactic acid) المنتج من قبل البكتريا وكذلك يحرر الامونيا خلال تمثيله للاحماض الامينية مهيئا الفرصة امام البكتريا الحساسة للحامض(acid-sensitive bacteria)مثل *Brevibacterium* للنمو على سطح الاجبان معطية بذلك نكهة وجودة للجبن(**Eliskases &Ginzinger ,1995**).

وبالنظر لقلة الدراسات التي تسلط الضوء على الفطر *Geotrichum* sp فقد أرتأينا القيام بهذه الدراسة التي تهدف الى عزل وتشخيص الفطر من ثمار الطماطة المصابة به ودراسة بعض الخصائص المظهرية والبايوكيميائية والوراثية للفطر أعلاه.

طرائق العمل Methods

1 .عزل الفطر *Geotrichum sp* Isolation of

١ . ٢ .عزل الفطر من ثمار الطماطة

تم جلب(١٣) عينةمن ثمار الطماطة المستوردة والمحلية من الأسواق المحلية و التي ظهر عليها أعراض وعلامات الإصابة بالفطر ***Geotrichum*** spp ووضعت في طبق بتري حاوي على هايبوكلورات الصوديوم بتركيز ١.٥ % لمدة دقيقتين بعدها تم تحضير قطع صغيرة بطول ٢ مل من هذه الثمار نقلت القطع المعقمة إلى أطباق حاوية على ماء مقطر معقم ولمدة دقيقة واحدة ثم نقلت مباشرة إلى أطباق بتري حاوية على ورق نشاف لغرض تجفيفها ثم زرعت في أطباق قطرها ٩ سم حاوية على وسط P.D.Aوبواقع أربع قطع عند محيط الطبق وقطعة خامسة في مركز الطبق ،حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥ ±٢ مْ لمدة أربعة أيام وبعد انتهاء مدة الحضن تم تنقية عزلات الفطر بنقل قرص قطره ٥ملم من كل مستعمرة وزرع في طبق جديد كررت العملية عدة مرات للحصول على عزلة نقية للفطر ومن ثم تشخيصها.

٢ .٣ .عزل الفطر من معجون الطماطة .

تم جلب (٧)عبوات من معجون الطماطة من الأسواق المحلية وكانت هذه العبوات منتجة من قبل شركات مختلفة (تركية ،إيرانية،سورية) حيث تم فتح هذه العبوات وأستخدم جزء منها ثم توبعت علامات الإصابة المرضية بالفطر***Geotrichum sp*** ،بعدها اخذ من كل عبوة مصابة عينة مقدارها ١ غم وأجريت لها سلسلة من التخافيف من $١٠^{١}$ –$١٠^{٦}$ بعدها اخذ١مل من كل من التخفيفين $١٠^{٥}$ و$١٠^{٦}$ وزرع على وسط P.D.A إذ تم نشره على سطح الوسط بواسطة ناشر زجاجي(Spreader) وبواقع أربع أطباق لكل عينة،حضنت الأطباق بدرجة حرارة ٢٥ ±٢ مْ لمدة أربعة أيام.

٢ . ٤ . تشخيص الفطر Diagnostic of fungus

تم تشخيص الفطر بالاعتماد على الصفات التشخيصية والمتمثلة بالصفات المظهرية والمجهرية التي أوردها كل من (**Moubasher, (1993** و**(2000)., DeHoog *et al*, (٢٠٠٠)2008 David,**) .

بالإضافة إلى الاختبارات التالية:

١ .الاختبارات البايوكيمياوية Biochemical tests

أ. تخمر السكريات Sugar fermentation

أستخدم وسط تخمر السكريات المكون من وسط ماء الببتون والمضاف إليه ٢ % من كل من محلول السكر المراد اختباره و٠.٠٥ من وسط تخمر السكريات المحضر في الفقرة (٣ .٢ .٢) .(علما أن السكريات تم تعقيمها بالترشيح بواسطة أوراق Millipore 0.45)صب الوسط في أنابيب سعة ٥ مل ولقح بـ ٥ مايكروليتر من العالق الفطري بعدها حضنت الأنابيب بدرجة حرارة ٢٥ مْ لاختبار قابلية العزلات على تخمر السكريات.تعد النتيجة موجبة بتغير لون الوسط.(**Roberts,1990**).

ب.استهلاك السترات Assimilation of citrate

أجري هذا الاختبار باستخدام أطباق بتري حاوية على اكار سيمون ستريت حيث لقح كل طبق بقرص من مستعمرة الفطر النامية على وسط PDA لمدة أسبوع،حضنت أطباق السيمون ستريت على درجة حرارة ٢٥ م لمدة ثلاثة أيام،تحول لون الوسط من الأخضر إلى الأزرق يدل على ايجابية الفحص. (**Collee *et al.*,1996**) .

ج.النمو على وسط النتروجين الأساسي Nitrogen base media Growth on

لقح وسط النتروجين الأساسي بقرص من مستعمرات الفطر النامية وحضن بدرجة حرارة ٢٥ مْ لمدة أسبوع لاختبار قابلية الفطر على استخدام النتروجين كعامل نمو. (**Collee *et al*** .،١٩٩٦) .

د.النمو على وسط لاكتات الصوديوم Growth on Sodium lactate media

لقح وسط لاكتات الصوديوم بقرص من مستعمرات الفطر النامية على وسط PDA وحضن بدرجة حرارة ٢٥ مْ لمدة أسبوع لاختبار قابلية الفطر على استخدام لاكتات الصوديوم كعامل نمو.. (**Collee et al.,1996**) .

٢ . الكشف عن الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA :

١ .أستخلاص الـ DNA وترحيله .

بعد تشخيص الفطريات بالاعتماد على الصفات المظهرية والأختبارات البايوكيمياوية وللتأكد من صحة هذا التشخيص تم استخلاص DNA لبعض عزلات الفطر المدروسة وبأتباع طريقة التمليح (Salting out method) المذكورة من قبل (**Sambrook *et al.*,**(١٩٨٩ وكالآتي :

١ .اختيرت (٣)عزلات عشوائيا من العزلات المدروسة ونميت على وسط (P.D.A)،بعدها أخذ نمو فطري ملئ Loop من كل عزلة ووضع في أنبوب مختبري حاوي على ٢ مل من الماء المقطر المعقم ورجت جيدا.

٢ .أخذ ١.٥ مل من العينة أعلاه وعرض للطرد المركزي بقوة ٥٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٠ دقائق وبدرجة حرارة ٢٥ مْ.بعدهاتم التخلص من الرائق وأخذ الراسب وأضيف أليه ٥٠٠٠ مايكروليتر من مادة SED وترك لمدة دقيقتين،ثم أضيف للمحلول١٠ مايكروليتر من الأنزيم الحال Lysozyme ووضع في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ساعة.

٣ .أضيف للمحلول أعلاه ١٤ مايكروليتر من أنزيم Protease K ومزج باليد الى أن تجانس المحلول بعدها أضيف أليه٦٠ مايكروليتر من مادة SDS ومزج باليد أيضا إلى أن تجانست محتويات الأنبوب بعدها وضع في حمام مائي بدرجة حرارة ٥٥ مْ لمدة ساعتين.

٤ .أضيف للمزيج أعلاه ٢٠٠ مايكروليتر من ملح الصوديوم Nacl بتركيز ٥ مولاري ومزج باليد لمدة دقيقتين ثم أضيف أليه ٥٠٠ مايكروليتر من الكلوروفورم ومزج جيدا بأستخدام المازج الدوار (Vortex) لمدة ٣٠ دقيقة .ثم وضع الأنبوب الحاوي على المكونات أعلاه في جهاز الطرد المركزي بقوة ٤٥٠٠دورة /دقيقة بدرجة حرارة ٢٠ مْ لمدة ١٥ دقيقة .

٥ .أخذ ١٠٠ مايكروليتر من الطبقة العليا (Supernatant) وأضيف أليها ٦٠ مايكروليتر من كحول الأيزوبروبانول (Isopropanol) ،رجت جيدا باليد وتركت لمدة ٣٠ دقيقة في درجة حرارة الغرفة .

٦ .عرضت الأنبوبة للطرد المركزي بقوة ٤٥٠٠ دورة /دقيقة وبدرجة حرارة ٣٧ مْ لمدة ١٥ دقيقة بعدها أخذ الراسب المتكون وأضيف أليه ٣٠٠ مايكروليتر من كحول الأيثانول المعقم بتركيز ٧٠ %،ثم وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بقوة ٤٥٠٠ دورة /دقيقة وبدرجة حرارة ٢٥ مْ لمدة دقيقتين .

٧.أخذ الراسب وترك لمدة ١٥ دقيقة للتخلص من الأيثانول ثم اأضيف أليه ١ مايكروليتر من مادة TE ،ثم وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي بقوة ٤٥٠٠ دورة /دقيقة وبدرجة حرارة ٥٥ مْ لمدة ساعة .بعدها أصبحت الأنابيب جاهزة للترحيل .

٨ .وضع ٢٥ مل من دارئ X–TBE١في بيكر، وأضيف إليه ٠.٢ غم من الاكاروز ثم أضيف إلى المزيج الأخير٠.٥ مايكرو لتر من صبغة الـ Ethidium bromide. بعدها وضع البيكر على لوح

التسخين إلى حد الغليان بحيث أذيبت جميع مكوناته بعدها رفع من لوح التسخين وترك ليبرد إلى درجة حرارة ٥٠ –٦٠ مْ.

٩ .حضرت صفيحة إسناد الأكاروز Tray ،ثبت مشط تكوين الحفر Comb على بعد ١ سم من أحد طرفي الصفيحة ثم صب هلام الأكاروز في الصفيحة وترك ليتصلب لمدة ٣٠ دقيقة ثم رفع مشط تكوين الحفر بهدوء من الهلام المتصلب الذي نقل إلى حوض الترحيل الكهربائي Electrophoresis Tranck .

١٠ .غطي هلام الأكاروز بدارئ TBE بارتفاع ٣ ملم (حتى ينغمر سطح الهلام).

١١.أضيف ٩ مايكرولتر من الحامض النووي منقوص الأوكسجين (DNA)إلى ٣ مايكرولتر من صبغة الـBromophenol blue أي بنسبة ١:٣ ثم وضعت في الحفر في جيل الاكاروز. ربطت الأقطاب بصورة مناسبة بحيث يربط القطب الموجب بالموجب الموجود بمجهز الطاقة لجهاز الترحيل الكهربائي والقطب السالب بالسالب

١٢. أجريت عملية الترحيل الكهربائي بفولتية مقدارها ٨٠ فولت وبـ ١٠٠ ملي أمبير ولمدة ١–٢ ساعة (لحين وصول الصبغة الزرقاء إلى نهاية الهلام) ثم تم إيقاف عملية الترحيل ،بعدها تم فحص الهلام تحت الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي (٣٢٠ نانوميتر)بواسطة صندوق الأشعة فوق البنفسجية U.V Transilluminater وتم تصوير الهلام باستخدام كاميرا Digital لملاحظة الـ DNA المتداخل مع صبغة الـ Ethidium bromide بشكل حزم برتقالية اللون .

٢ .طريقة عمل تفاعل السلسلة المتبلمرة

Multiplex Polymerase Chain Reaction .

أ.المواد المستخدمة

استخدمت تقنية الـ Multiplex PCR لتضخيم الدنا المشفر لجينات ***SE1*** و ***SE2*** و***Lip*** بالأعتماد على طريقة(**Sanio and Nilanjan ,2008**)واستخدمت ثلاثة أزواج من البادئات كما موضح في الجدول التالي :

جدول (٣) البادئات المستخدمة في تنفيذ هذه التجربة .

البوادئ	تتابع البوادئ	الطول	درجة الذوبان
SE1	F.5-AA G TGG GCC CAT GAC ATT CCC CTT GCT A CC-3	٣٠	٦٤
SE1	R. 5-TAG TGG ATC TTA GAC ATG ACT GTT CCTCAG-3	٣٠	٦٤
SE2	F.5-GATGCTCTGACTATATATCTCTGTCGCCTGCTTAGATA-3	٣٨	٧٠
SE2	R. 5-TACCCGGATCATGGCCAGCATCCCGACGCTACCTTACA T-3	٣٨	٧٠
Lip	F. 5-z GCC CTC TGC TAA CAA GTC CTA C-3	٢٢	٥٥
Lip	R.5-TTT AAG TCG GGG CCC TTA CCT A-3	٢٢	٥٥

أجريت طريقة العمل بحجم ٢٥ مايكرو لتر وحسب ما موضح في الجدول التالي اعتمادا على النشرة المرفقة مع Green Master Mix المصنع من قبل شركة Promega. بمزج المواد التالية بأنبوب PCR كما موضح في الجدول التالي:

جدول (٤) المواد الكيميائية لخليط التفاعل و حجومها

المواد الكيماوية	الحجم
Go Taq Green Master Mix	١٢.٥مايكروليتر
Primer Forward	1مايكروليتر لكل جين
Primer Reverse	1مايكروليتر لكل جين
DNA	٥ مايكروليتر
D.W	١.٥ مايكروليتر

Total	**٢٥ مايكروليتر**

بعد اتمام جميع الاضافات مزجت العينات مركزيا بواسطة جهاز الطرد المركزي الخاص بأنابيب PCR (Centrifuge Ependroff) و نقلت العينات إلى جهاز PCR thermal cycler وضبط برنامج عمل الجهاز كالأتي:

جدول (٥) برنامج تقنية الـ PCR

رقم الخطوة	الخطوات	درجة الحرارة	الزمن	عدد الدورات
١	Denaturation1	٩٤ مْ	min٥	١
٢	Denaturation2	٩٤ مْ	min١	٣٠
٣	Annealing	٥٦ مْ	min١	
٤	Extention 1	٧٢ مْ	min٢	
٥	Extention 2	٧٢ مْ	min١٠	١

ب .الترحيل الكهربائي لنواتج تقنية الـ PCR:

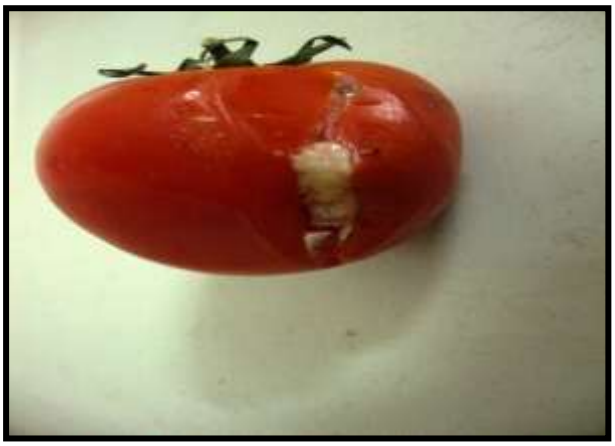
أتبعت نفس طريقة الترحيل للـ DNA و لكن استخدم هلام الاكاروز بتركيز ٢% مع صبغة الـ Ethidium bromide لعرض نتائج الـ PCR.

إن ظهور حزمة عند القاعدة الزوجية ٣٨٠ يشير إلى وجود جين الـ ***SE1*** السائد الوجود في النوع ***G.candidum*** وغير الموجود في النوع ***G.penicillatum*** وظهور الحزمة عند القاعدة الزوجية ٢١٠ يشير إلى وجود جين ***SE2*** السائد في النوع ***G. penicillatum***وغير موجود في النوع ***G.candidum*** أما وجود حزمة عند القاعدة الزوجية ٣٠٠ فيشير إلى وجود جين **Lipase** المتواجد في كافة أنواع الفطر ***Geotrichum*** .

النتائج والمناقشة Results and Discussion

1.أعراض الاصابة بالفطر *Geotrichum* sp لثمار الطماطة والمعجون.

ظهرت أعراض الاصابة بالفطر أعلاه على هيئة بقع صغيرة طرية لاتلبث أن تتسع هذه البقع وتمتد الاصابة داخل أنسجة ثمار الطماطة وتصبح المنطقة المصابة مائية ويظهر عليها مسحوق طحيني الى دهني الملمس أبيض الى أصفر اللون ومن ثم تتحلل الثمرة وتفقد قوامها كليا وتظهر هذه الاعراض بوضوح على ثمار الطماطة المخزونة في الاماكن المبردة كالبرادات والثلاجات (صورة١ ،B). أماعلى معجون الطماطة فتظهرأعراض الأصابةعلى هيئة طبقة بيضاء مسحوقية أوصفراء دهنية الملمس تغطي مادة المعجون خاصة في العبوات الكبيرة والمتوسطة الحجم والتي تفتح ويستعمل جزء منها ويخزن الجزء الاخر في الثلاجات وهذه النتيجة تتوافق مع ماذكره.(**Wade *et al.*,2008**) .



B A

صورة(1) ثمار طماطة(A) ثمار طماطةسليمة (B) ثمار طماطة مصابة بالفطر*Geotrichum sp*

2.عزل وتشخيص الفطر *Geotrichum* sp

تم عزل (٢٠)عزلة (١٣ عزلة منها عزلت من ثمار الطماطة المصابة و٧ من معجون الطماطة المصاب)من الفطر ***Geotrichum*** sp واظهرت النتائج ان العزلات الفطرية المدروسة ابدت تباينا واضحافي الصفات المظهرية والاختبارات البايوكيمياوية ويمكن تلخيص ذلك بمايلي:

٢ .١ .الصفات المظهرية لمستعمرات الفطر *Geotrichum* sp

تميزت (١٢) عزلة من العزلات (٩عزلت من ثمار الطماطة المصابة و٣ من معجون الطماطة المصاب) بتكوينها مستعمرات بيضاء ذات اشكال منتظمة وبهيئة مسحوق على وسط P.D.A تتحرر قطرات ماء من

سطحهاولاتنتج الصبغات،و تظهرمناطق دائرية واضحة في وسط المستعمرة سببها ارتفاع المستعمرة الى الاعلى في المنطقة الوسطية ولها القابلية على النموهوائيا ولاهوائيا رمز لهذه العزلات بالرمز(G1–G12).(صورة٢ ،A) .

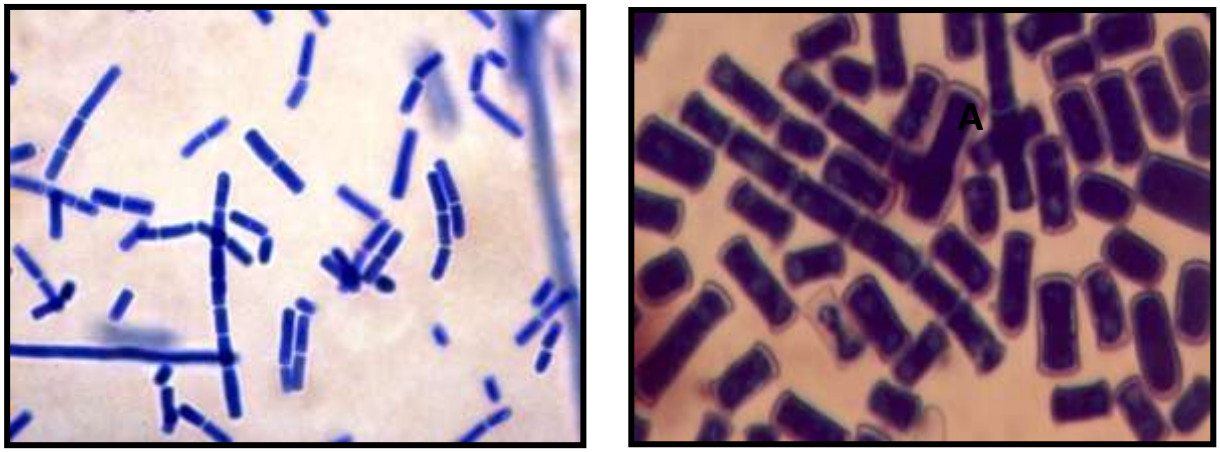
B A

صورة (٢).(A).مستعمرات لعزلة ممثلة لمجموعة العزلات (G1–G12) نامية على وسطP.D.A ، (B) مستعمرات لعزلة ممثلة لمجموعة العزلات(G13–G20) نامية على وسطP.D.A

اما العزلات الثمانية الاخرى(٤ منها عزلت من ثمار الطماطة المصابة و ٤ من معجون الطماطة المصاب) فظهرت على شكل مستعمرات صغيرة بيضاء ذات حواف غير منتظمة على وسط P.D.A .وذات ملمس دهني ولاتنتج الصبغات ،و تظهر في وسط المستعمرة مناطق دائرية غيرمرتفعة و لها القابلية على النمو هوائياولاهوائيا رمز لها بالرمز(G13–G20). (صورة٢،B).

٢ .٢ .الصفات المجهرية لمستعمرات الفطر *Geotrichum sp*

بينت نتائج الفحص المجهري ان العزلات الاثنى عشر ذات غزل فطري شفاف مقسم وتكون السبورات المفصلية (Arthrospores)مستطيلة الشكل محاطة بمحفضة تصطبغ باللون الازرق الغامق عند تصبيغها بصبغة كرام. (صورة ٣ ،A). اما العزلات الثمان المتبقية فيكون الغزل الفطري شفاف ايضا وتكون السبورات المفصلية مستطيلة الشكل نحيفة متطاولة والمحفضةغير واضحة تأخذ اللون الازرق الفاتح بعد صبغها بصبغة كرام. (صورة ٣، B).



B A

صورة(٣)السبورات المفصلية لعزلتين من عزلات الفطر *Geotrichum* sp بعد تصبيغها بصبغة كرام.(قوة التكبير 40 X). A = السبورات المفصلية لعزلة من مجموعة عزلات(G1-G12).

B = السبورات المفصلية لعزلة من مجموعة عزلات(G 13-G20).

٢ .٣ .الخصائص البايوكيمياوية لعزلات الفطر *Geotrichum sp*

يوضح الجدول (٦) نتائج الاختبارات البايوكيمياوية للعزلات التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة

جدول(٦) .الخصائص البايوكيمياوية لعزلات الفطر *Geotrichum sp*

الاختبارات البايوكيمياوية	العزلات الفطرية	
	G1-G12	G13-G20
D-xylose	+	+
Cellibiose	-	-
Maltose	-	-
Glucose	+	+
D-Manitole	+	+
Sucrose	+	+
L-arabinose	-	-
Galactose	+	+
Lactose	+	+

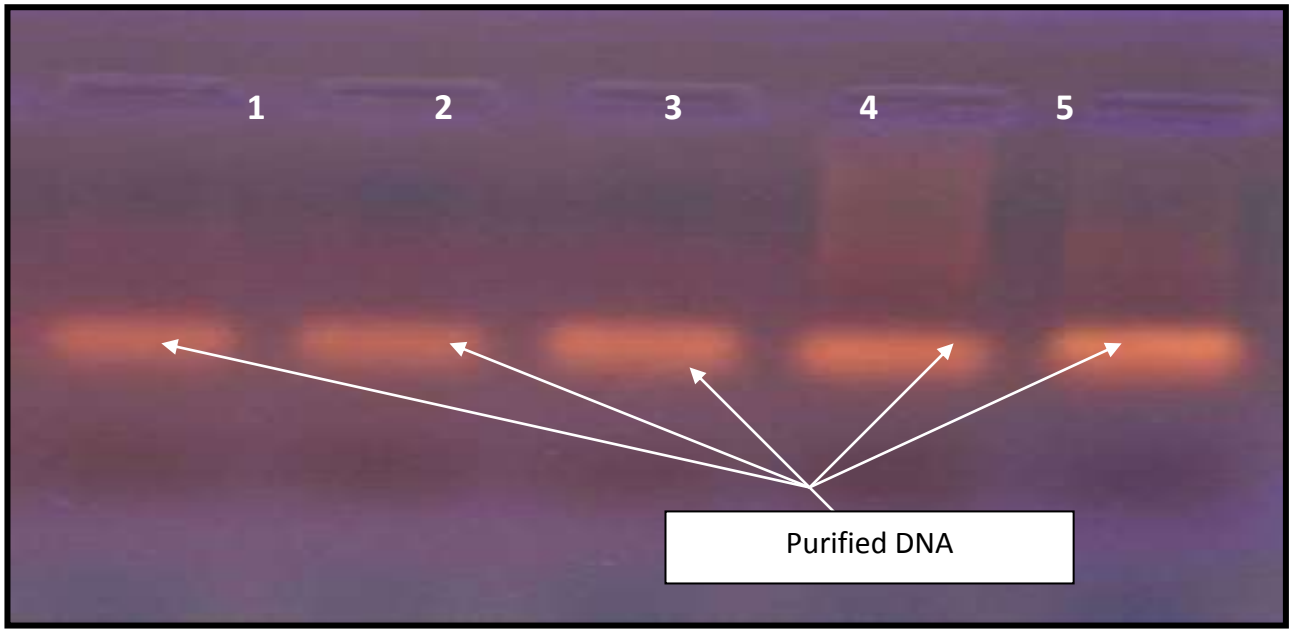
Sorbitol	**+**	**+**
Trehalose	**+**	**-**
Yeast nitrogen base	**+**	**+**
Simmon citrate	**-**	**+**
Sodium citrate	**-**	**-**
D-Sodium lactate	**+**	**+**
glucoside-D-Methyle-α	**-**	**-**
N-acetyle-Glucose amine	**+**	**-**
2-Keto-D-gluconate	**-**	**-**
التشخيص	***G.candidum***	***G.penicillatum***

+ = تعني حدوث التخمر.

- = تعني عدم حدوث التخمر.

2. 4الخصائص الوراثية لعزلات الفطر *Geotrichum sp*

أظهرت نتائج ترحيل الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA لخمسة عزلات أثنان منها أختيرت من المجموعة (G1–G12)وواحدة فقط من المجموعة (G13–G20) بالأضافة الى العزلتين القياسيتين للفطرين ***G.candidum*** و ***G.penicillatum*** أن جميع العزلات المدروسة تحتوي على DNA يأخذ نفس الموقع على صفيحة أسناد الأكاروز صورة (٤) .



صورة (4) الترحيل الكهربائي ((Electrophoresis للـ DNA على هلام الأكاروزبتركيز. 0.8%

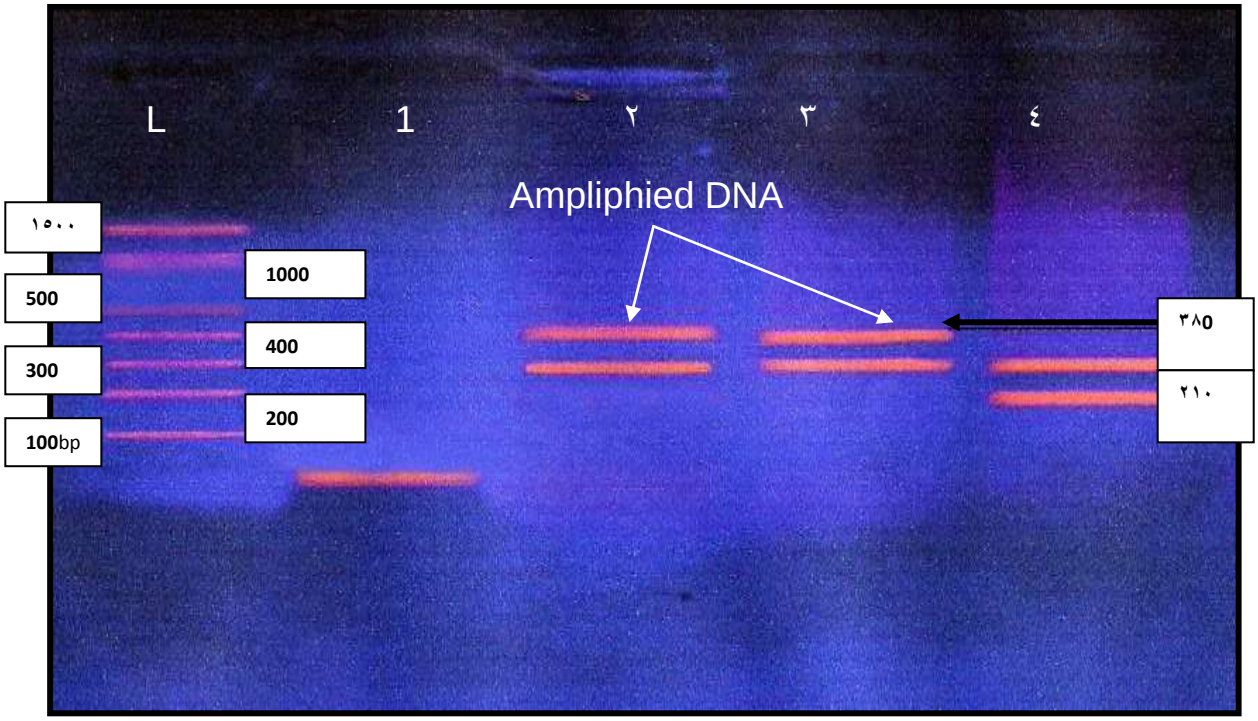
= 1 **العزلة القياسية للفطر. *G.candidum***

٢ = العزلة القياسية للفطر ***G.penicillatum***

٣,٤ = عزلتان مختارة من المجموعة(G1-G12) .

٥= عزلة مختارة من المجموعة(G13-G20).

أما نتائج تقنية الـ PCR فأشارت بوضوح الى وجود جين ***SE1*** في الحامض النووي للفطر ***G.candidum*** ووجود جين ***SE2*** في الحامض النووي للفطر ***G.penicillatum*** بالأضافة الى الجين المشفر لأنزيم اللايبيز***Lip*** الموجود في جميع الأنواع التابعة للفطر ***Geotrichum***. صورة (٥).



صورة (5) الترحيل الكهربائي ((Electrophoresis لنواتج تقنية الـ PCR على هلام الأكاروز بتركيز% 2

Lane ١ =سيطرة موجبة.

Lane 2 = عزلة الفطر *G.candidium* حاوية على جيني *SE1* و*Lip*.

Lane 3 = عزلة الفطر *G.candidium* حاوية على جيني *SE1* و *Lip*.

Lane 4 = عزلة الفطر *G.penicillatum* حاوية على جيني *SE* 2 و *Lip*. L = DNA Leade r

يعد جينا ***SE1*** و ***SE2***من الجينات المشفرة لأنزيم polygalacturonase الذي يعمل على تحليل الجدار الخلوي للنبات أذ يمتلك النوع ***G.candidum*** جين(***SE1***)الذي يشفر لهذا الأنزيم في حين يكون الجين المسؤول عن أنتاج هذا الأنزيم في النوع ***G.penicillatum*** هو (***SE2***) وهما يعدان من الصفات التشخيصية المهمة لهذين الفطرين على المستوى الجيني . (**Masyuki *et al.*,2003**).

أن الصفات التشخيصية المدروسة سواء الصفات المظهرية والمجهرية أو البايوكيمياوية أو الوراثية أثبتت أن عزلات الفطر والتي رمز لها بالرمز (G1–G12) تعود للفطر ***Geotrichum candidum*** وأن

العزلات التي رمز لها بالرمز (G13–G20) تعود للفطر ***Geotrichum penicillatum***. كون الصفات التي أظهرها كلا النوعين تتطابق مع الصفات التصنيفية لهما والتي ذكرها كل من **Moubasher, (1993)**، ٢٠٠٠, **De Hoog *et al.*, David,(2008)**

المصادر **References**

- **Bendove, R.A.and Ashe,B.L.(1999)**.*Geotrichum* septicemia .Arch.Int.Med. 89-107.
- **Bertolini,M.C.Schrage,J.D.;Cygler,E.;Ziomek,D,Y. Thomas and Vernet.(1995).**Expression and characterization of ***G.candidum*** Lipase I gene,Comparion of specificity profile with LipaseII.Eur.J.Biochem.12(8):228-869.
- **Collee,J.G,;Fraser,A.G.;Marmion,B.P.and Simmons, A. (1996) .**Practical Medical Microbiology.14th ed .Churchill Livingstone, London.pp.:106-716.
- **David,E.(2008).**Compendium of Soil,.Academic,Press,London.,UK,PP :12-45.
- **DeHoog,G.S.;Guarro,J.and Figueras,M.(2000)**.Atals of clinical fungi,2ed.. Centra alburea voors chemical culture,Netherland.PP:32-34.
- **DeHoog,G.S.;Smith,M.T.and Gueho,E.(2004).**Arevision of the genus ***Geotrichum*** and its telomorophs.Stud.Mycol.29:1-131.
- **Dziuba ,A.G.(1989).*Geotrichum* sp** .Mycopathologia.49(6)286-289.
- **ElisKases-Lechner,F.and Ginzinger,W.(1995).**The yeast flora of surfaceripened cheese.Milchwissenschaft.50:458-462.
- **Esser, K. and Lemke. P. A.(1996).** Series preface. In D. H. Howard and J. D. Miller (Eds.). The Mycota.. Springer Verlag. Berlin, Germany.Mycologia.J.12(10):13-15.
- **Gueguen ,G.U.Schmidt ,S.F.(1992**).Toxonomy and physiological properties of fungus causing soft rot disease .Phytopathology. J.52:1-5.
- **Holmquist,M.; Tessier D.C; Cygler, M.(1997).** Identification of residues essential for differential fatty acyl specificity of ***Geotrichum candidum*** Lipase I and II . Biotechnology Research Institute. National Research Council of Canada..pp:13-34.
- **Masyuki ,N.;Hisash ,I. Kei ,A.(2003)**.Polygaluctuornase from ***Geotrichum candidum*** expressed in ***Schizosaccharomyces*** promb versus S31GP2 regarding soft rot on lemon fruits.The phytopathological Society of Japan and Springer –Verlay –Tokyo.pp,78-98.
- **Moubasher,A.H.(1993).**Soil fungi in Qatar and Other Arab Countries.1st .ed. The Scientific and Applied Research Center University of Qatar.

- **Rajesh ,C.; Ramesh,K.; Arvind ,M. and Subhash, V.(2001).**Clinical bovine mastitis caused by ***Geotrichum candidum*** .Veterinarski .Arhiv.71(4).197-201.
- **Rippon,J.W.; Jack ,S.F.;Alder ,G.K.(1982**).The pathogenic fungi and the pathogena actinomycetes in(Medical mycology)(2nd ed).W.B.Saunders company,philadehia,642.
- **Roberts,G.D.(1990).**Laboratory method in basic mycology in:Baily &Scotts ; Diagnostic Micro.(ed..Barren .E.J & Fingolld,S.M). The C.V.Mosby Co.Pp:125-143.
- **Sambrook ,J.;Fritgah ,E. and Manniatis ,T.(1989)**.Molecular cloning :Laboratory manual .Clodsspring .Harpour laboratory .New York.Pp:142-147.
- **Sanio ,P. and Nilanjan ,R.(2008).** Cloning and Characterization ***Geotrichum candidum*** Histidinol Dehydrogenes .International Journal of Integrative Biology .3(1):126-128.
- **Wade,W.N.;Vasdinnyei,R.;Deak,T.andBeuchat,L.R.(2008)** Proteolytic yeast isolated from raw, ripe tomatoes and metabiotic association of ***Geotrichum candidum*** . Center for food safety,university of Georgia,Griffin,GA.