

در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس، ناحیه‌ی بتا توبولین کلیه‌ی نمونه‌ها با موفقیت تقویت گردید و برای تمامی ایزوله‌ها یک باند به اندازه‌ی تقریبی ۵۷۰-۵۴۰ جفت باز مشاهده گردید. شکل ۱ نمونه‌ای از الکتروفورز محصولات PCR ژن بتا توبولین مربوط به چند جدایه‌ی اسپرژیلوس را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود ژن بتا توبولین در اسپرژیلوس‌ها دارای باند با وزن تقریبی مساوی می‌باشد.

در جدول ۱، نتایج تعیین توالی ژن بتا توبولین از چند نمونه‌ی اسپرژیلوس جدا شده در این مطالعه، به عنوان نمایندگان گروه‌های مختلف مورفولوژیک ملاحظه می‌شود. تمام نمونه‌ها دارای ۹۹-۱۰۰ درصد تشابه سکانس با نمونه‌های استاندارد موجود در پایگاه داده‌ی NCBI می‌باشند.

بدین ترتیب از ۲۱ نمونه‌ای که تعیین توالی شدند، ۷ ایزوله به عنوان اسپرژیلوس فلاوس، ۳ ایزوله به عنوان اسپرژیلوس فومیگاتوس، ۳ ایزوله اسپرژیلوس چوالیری، ۲ ایزوله اسپرژیلوس روبس، ۲ ایزوله اسپرژیلوس نیوگلاکوس، ۲ ایزوله اسپرژیلوس توبینزنسیس، ۱ ایزوله اسپرژیلوس نایجر و ۱ ایزوله نیز به عنوان گونه‌ی اسپرژیلوس ورسیکالر تشخیص داده شد. پس از معلوم شدن ماهیت جدایه‌ها در سطح گونه از طریق تعیین توالی، به طور مجدد به بررسی دقیق نمونه‌ها از لحاظ ریخت شناسی میکروسکوپی و انطباق این نتایج با نتایج مولکولی پرداخته شد. با توجه به متون موجود در این زمینه مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی تمام ۲۱ ایزوله با ویژگی‌های گونه‌ای که توسط Sequencing معین شده بود، به طور کامل تطابق داشتند.

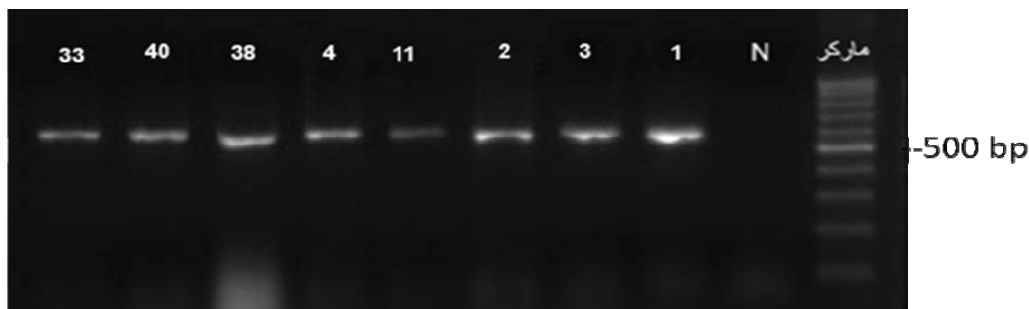
شکل ۲ تصویر مناظر میکروسکوپی برخی

به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل و از باندها عکسبرداری به عمل آمد. بعد از انجام PCR و تکثیر ناحیه‌ی بتا توبولین، بر اساس تفاوت و یا تشابه در مورفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی، کلنی‌ها گروه بندی شدند و سپس از محصولات PCR ۲۱ ایزوله، به عنوان نمایندگان گروه‌های مختلف مورفولوژیک، تعیین توالی توسط هر دو پرایمر رفت و برگشت به صورت دو طرفه به عمل آمد.

توالی خام نوکلئوتیدی زنجیره‌های رفت و برگشت تک تک نمونه‌ها با نرم‌افزار MEGA 4 (MEGA version 4, Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007) ویرایش شد و بدین ترتیب سکانس نهایی بتا توبولین هر ایزوله به دست آمد. توالی‌ها، با استفاده از نرم‌افزار BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) با توالی‌های مشابه در بانک ژن (GenBank) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند. شناسایی ایزوله‌ی مورد نظر در صورت وجود تشابه توالی بالا (۹۹-۱۰۰ درصد) با یک یا بیش از یک توالی قابل اطمینان از یک گونه‌ی شناخته شده در پایگاه داده‌های NCBI انجام شد.

یافته‌ها

از مجموع ۶۰۰ ایزوله‌ی قارچی که از خاک و هوای محیط‌های مختلف اعم از بیمارستان و اماکن طبیعی و عمومی جدا گردید، ۱۹۶ ایزوله مشکوک به اسپرژیلوس بود. مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی این ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفت و به چند گروه مورفولوژیک تقسیم گردید. از هر کدام از این گروه‌ها یک یا چند نماینده انتخاب و عملیات مولکولی روی آن‌ها انجام شد.



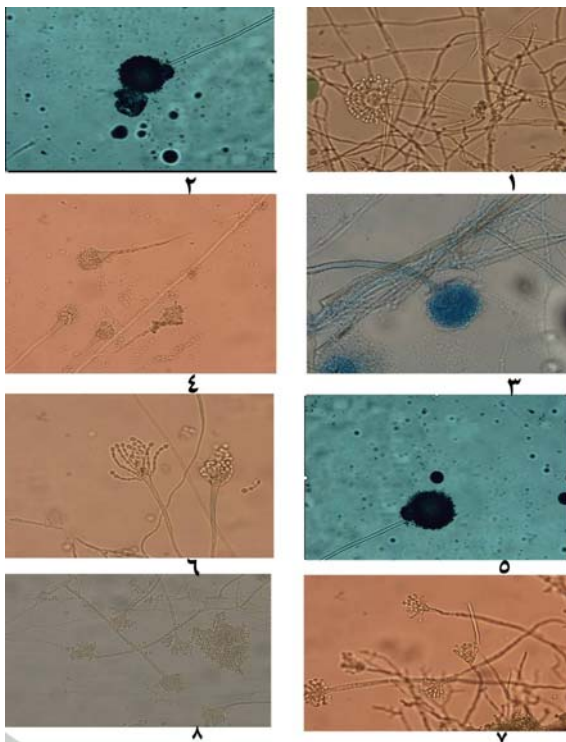
شکل ۱. الکتروفورز محصول PCR ناحیه‌ی بتا توپولین چند نمونه‌ی اسپرژیلوس. پس از تعیین توالی و مقایسه با داده‌های بانک ژن، نمونه‌ی شماره‌ی ۳۳ اسپرژیلوس فلاوس، شماره‌ی ۴۰ اسپرژیلوس نایجر، شماره‌ی ۳۸ اسپرژیلوس توپینزنسیس، شماره‌ی ۴ اسپرژیلوس چوالیری، شماره‌ی ۱۱ اسپرژیلوس روبر، شماره‌ی ۲ اسپرژیلوس نیوگلاکوس، شماره‌ی ۳ اسپرژیلوس فومیگاتوس و شماره‌ی ۱ اسپرژیلوس ورسیکالر تشخیص داده شد.

ردیفه و کونیدی کروی سیاه رنگ از مشخصات این گونه است. شکل ۳-۲ ساختار میکروسکوپی اسپرژیلوس شماره‌ی ۳۳ را که با تعیین توالی به عنوان اسپرژیلوس فلاوس تشخیص داده شد، نشان می‌دهد که دارای کونیدیوفور بلند با دیواره‌ی ضخیم و خاردار، وزیکول کروی، فیالایدهای یک یا دو ردیفه، کونیدی‌های بیضی و کروی می‌باشد. شکل ۴-۲ مربوط به ریزینی جدایه‌ی شماره‌ی ۳ است که با تعیین توالی به عنوان اسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی شد و دارای کونیدیوفور صاف، فیالاید یک ردیفه، وزیکول بطری شکل، کونیدی کروی شکل و آرایش کونیدی به صورت ستونی می‌باشد.

ایزوله‌های اسپرژیلوس را که نمایندگان گروه‌های مورفولوژیک مختلف در مطالعه بودند، نشان می‌دهد. در شکل ۱-۲ منظره‌ی ریزینی ایزوله‌ی اسپرژیلوس شماره‌ی ۱۱ که با تعیین توالی به عنوان اسپرژیلوس روبر تشخیص داده شد، مشاهده می‌شود. چنانچه ملاحظه می‌گردد کونیدیوفور صاف، فیالاید یک ردیفه، وضعیت کونیدی شعاعی، شکل وزیکول کروی و شکل کونیدی کروی-بیضی می‌باشد. در شکل ۲-۲ مشخصات میکروسکوپی ایزوله‌ی شماره‌ی ۴۰ که با تعیین توالی به عنوان اسپرژیلوس نایجر شناسایی شد، ملاحظه می‌شود. کونیدیوفور صاف و فاقد دیواره‌ی عرضی، وزیکول کروی، فیالاید دو

جدول ۱. نتایج حاصل از تعیین توالی نمونه‌های اسپرژیلوس و مقایسه‌ی آن‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن.

میزان تشابه (درصد)	گونه‌ی اسپرژیلوس واجد بیشترین تشابه	میزان همپوشانی ناحیه آنالیز شده در Blast	شماره‌ی نمونه‌ها
۱۰۰	اسپرژیلوس روبر	۱۰۰	۱۱، ۶
۱۰۰	اسپرژیلوس چوالیری	۱۰۰	۱۴، ۵، ۴
۱۰۰	اسپرژیلوس فومیگاتوس	۱۰۰	۳۴، ۳۰، ۳
۹۹	اسپرژیلوس نیوگلاکوس	۱۰۰	۱۰، ۲
۹۹	اسپرژیلوس ورسیکالر	۱۰۰	۱
۱۰۰	اسپرژیلوس فلاوس	۱۰۰	۳۷، ۳۳، ۳۲، ۳۱، ۱۵، ۱۳، ۱۲
۱۰۰	اسپرژیلوس نایجر	۱۰۰	۴۰
۱۰۰	اسپرژیلوس توپینزنسیس	۱۰۰	۳۸، ۳۹



شکل ۲. منظره‌ی میکروسکوپی تعدادی از جدایه‌های اسپرژیلوس که پس از تعیین توالی شناسایی شدند. ۱: اسپرژیلوس روبر، ۲: اسپرژیلوس نایجر، ۳: اسپرژیلوس فلاووس، ۴: اسپرژیلوس فومیگاتوس، ۵: اسپرژیلوس توبینزنسیس، ۶: اسپرژیلوس نیوگلاکوس، ۷: اسپرژیلوس چوالیری، ۸: اسپرژیلوس ورسیکالر

خود حاوی گونه‌ها و واریته‌های مختلفی مانند فلاوی، فومیگاتی، نیجری و غیره می‌باشد (۱۴-۱۶).

اسپرژیلوس‌ها قارچ‌هایی با ماهیت دو گانه (مفید و یا به ظاهر مضر) هستند. برخی از آن‌ها پاتوژن هستند و در انسان و حیوان عفونت‌هایی نظیر اسپرژیلوزیس ریوی و مهاجم، مایستوما، کراتیت و اتومایکوزیس ایجاد می‌کنند؛ به طوری که از ۱۸۰ گونه‌ی اسپرژیلوس که تاکنون توصیف شده است، حدود ۴۰ گونه از عفونت‌های قارچی انسانی جدا شده‌اند (۱۷-۱۸). از سوی دیگر، اسپرژیلوس‌ها از زمان‌های قدیم به منظور تهیه و تخمیر برخی مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تعدادی از متابولیت‌های این جنس در پزشکی اهمیت دارند مانند

شکل ۵-۲ نیز نمای میکروسکوپی اسپرژیلوس شماره‌ی ۳۸ را که در تعیین توالی اسپرژیلوس توبینزنسیس شناسایی شد، نشان می‌دهد. این گونه واجد کونیدیوفور صاف و فاقد دیواره‌ی عرضی، وزیکول کروی، فیالاید دو ردیفه و کونیدی کروی سیاه رنگ می‌باشد. شکل ۶-۲ مربوط به منظره‌ی میکروسکوپی جدایه‌ی شماره‌ی ۲ است که پس از تعیین توالی اسپرژیلوس نیوگلاکوس تشخیص داده شد. کونیدیوفور صاف، فیالاید یک ردیفه، کونیدی بیضی تا کروی شکل و آرایش کونیدی بر روی وزیکول به صورت شعاعی که از مشخصات این گونه هستند در شکل مذکور قابل مشاهده می‌باشند. در شکل ۷-۲ منظره‌ی میکروسکوپی جدایه‌ی شماره‌ی ۴ که در تعیین توالی به عنوان اسپرژیلوس چوالیری شناسایی شد، مشاهده می‌شود. کونیدیوفور صاف، فیالاید یک ردیفه، وزیکول قاشقی، آرایش شعاعی کونیدی‌های بیضی تا کروی شکل که اختصاصی این گونه هستند در شکل مذکور به خوبی قابل رؤیت هستند. شکل ۸-۲ نیز مربوط به نمای ریزینی اسپرژیلوس شماره‌ی ۱ است که در تعیین توالی، اسپرژیلوس ورسیکالر شناسایی شد و دارای کونیدیوفور صاف، وزیکول کروی، فیالاید دو ردیفه، کونیدی کروی شکل و آرایش شعاعی کونیدی‌ها می‌باشد.

بحث

اسپرژیلوس‌ها از شایع‌ترین قارچ‌های محیطی هستند؛ به طوری که کونیدی‌های (اسپور) آن‌ها را از سطوح میوه‌ها، نان، دانه‌های غلات و به طور کلی همه جا در آب، خاک و هوا به آسانی می‌توان جدا کرد (۱۳). بر اساس تقسیم بندی جدید، جنس اسپرژیلوس به بخش‌های مختلف تقسیم شده است که هر بخش

داروی لووستاتین که از آسپرژیلوس ترئوس و یا داروی سیلوفانژین که از تغییرات شیمیایی اکتینوکاندین B از آسپرژیلوس نیدولانس به دست می‌آید (۱۹). روش‌های متداول جهت شناسایی و افتراق گونه‌های آسپرژیلوس اغلب وقت‌گیر بوده، نیاز به تجربه و مهارت بالایی دارند (۷)، بنابراین به کارگیری یک روش دقیق برای افتراق گونه‌ها ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر با معرفی تکنولوژی PCR موفقیت‌های چشمگیری در افتراق بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله آسپرژیلوس‌ها حاصل شده است. تاکنون مولکول‌های DNA مختلفی برای بررسی و شناسایی آسپرژیلوس‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از جمله مهم‌ترین آن‌ها قطعات ITS (۲۰، ۸) و ژن‌های Calmodulin (۲۱)، Actin (۲۲) و کیتین سنتتاز (۱۰) بوده است.

تا آن جا که ما بررسی نمودیم هیچ مطالعه‌ای جهت شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس با روش PCR-sequencing از ژن بتا توبولین در ایران انجام نشده بود، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر بر آن شدیم تا با استفاده از این روش سویه‌های آسپرژیلوس را که از برخی محیط‌ها جدا شده بودند در سطح گونه مورد شناسایی قرار دهیم. ۲۱ ایزوله‌ای که تعیین توالی از ژن بتا توبولین آن‌ها به عمل آمد، همگی به این روش در سطح گونه شناسایی شدند و این در حالی بود که تنها ۱۲ عدد از این ایزوله‌ها توسط روش‌های فنوتایپیک شناسایی شدند و هویت ۹ گونه به صورت ناشناخته یا مشکوک باقی ماند. این یافته حاکی از آن ابود که استفاده از تغییرات (Variation) موجود در سکانس ناحیه‌ی ژنی بتا توبولین در مقایسه با روش‌های مورفولوژیک از کارایی چشمگیرتری جهت افتراق و شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار است. دیگر

این که در مطالعه‌ی حاضر، آسپرژیلوس فلاووس شایع‌ترین جدایه‌ی مورد شناسایی بود که این موضوع با مطالعه‌ی میرهندی و همکاران تطابق داشت (۷). همچنین مشخص شد ایزوله‌هایی که اغلب بر اساس ریخت شناسی کلنی و ریزی، به عنوان آسپرژیلوس نایجر شناخته می‌شوند در واقع متعلق به ۲ گونه‌ی مجزا و غیرقابل افتراق از لحاظ مرفولوژی یعنی آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس توینزنسیس هستند که هر دو گونه متعلق به بخش نیگری (Nigri) از جنس آسپرژیلوس می‌باشند و این مهم تنها به کمک روش مولکولی تعیین توالی امکان‌پذیر شد. با توجه به تولید اکراتوکسین A توسط این دو قارچ و اهمیت آن‌ها در بیوتکنولوژی و پزشکی، تشخیص و تمایز این دو گونه از سایر اعضای بخش نیجری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۲). آسپرژیلوس چوالیری که در زمره‌ی جدایه‌های شناسایی شده در این مطالعه بود، از یک سو مشکلات جدی در صنعت تولید آب میوه به وجود می‌آورد؛ چرا که مقاوم به حرارت است و باعث فساد آب میوه‌هایی همچون گلابی و هلو می‌شود که به مدت طولانی نگهداری می‌شوند (۲۳). از سویی دیگر این گونه تنها قارچی است که از نظر تولید پولولان (Pullulan) با آئروبازیوم پولولانس رقابت می‌کند و به دلیل تولید مقادیر بالای پولولان استفاده‌ی صنعتی دارد. پولولان یک محلول با ویسکوزیته‌ی بالا می‌باشد که در صنعت کاربردهای فراوانی دارد و برای مثال در تهیه‌ی چسب‌ها، ضخامت دادن به مواد، تهیه‌ی فیلم‌ها و فیبرهای غیر قابل نفوذ به اکسیژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۴).

آسپرژیلوس روبر، دیگر گونه‌ای که در این مطالعه جدا شد نیز از جنبه‌های مختلف دارای اهمیت

بدین وسیله آسپرژیلوس‌های گوناگون از نقاط مختلف جداسازی، شناسایی و جمع‌آوری شود و سپس جهت استفاده در مطالعات بعدی در کلکسیون‌های محدود ملی نگهداری شوند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که روش تعیین توالی ناحیه‌ی بتا توبولین در مقایسه با روش‌های فنوتیپیک از دقت بسیار بالاتری برای تمایز گونه‌های آسپرژیلوس برخوردار است، لذا برای شناسایی دقیق آسپرژیلوس‌ها در حد گونه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد در دانشکده‌ی بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. بدین وسیله از زحمات و همکاری پرسنل مرکز آموزش و تحقیقات بهداشتی اصفهان از جمله خانم نیلوفر جلالی زند و آقای مهندس رضا جعفری و نیز آقای مهندس محسن گرامی شعار و سایر کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری رساندند، صمیمانه سپاسگزاری می‌نماییم.

می‌باشد. این گونه تولید آنزیم تاناز (Tannase) می‌نماید که از آن به عنوان کاتالیزور در تولید اسید گالیک استفاده می‌شود. همچنین از این گونه محلول PLEO RUB گرفته می‌شود که برای درمان تب یونجه کاربرد دارد (۲۵). به علاوه، این گونه در شرایط ویژه قدرت تولید و ترشح توکسین‌های خطرناکی همچون آفلاتوکسین را دارد که از نظر بهداشت مواد غذایی و مسمومیت‌های حاد و مزمن حایز اهمیت است (۲۶). با توجه به اهمیت آسپرژیلوس‌ها در بیماری‌زایی و حساسیت و مقاومت متفاوت آن‌ها به داروهای مختلف از یک طرف، و نیز مصارف متعدد این قارچ‌ها در صنعت از طرفی دیگر، یکی از اهداف بالقوه و کاربردی این مطالعه راه اندازی و استفاده از روش مولکولی تعیین توالی از ژن بتا توبولین جهت شناسایی جدایه‌های کلینیکی و محیطی آسپرژیلوس در سطح گونه در مراکز تشخیص طبی و صنعتی بود.

این پژوهش مقدمه‌ی مناسبی برای بررسی نمونه‌ها در مقیاس بزرگ‌تر از نقاط مختلف کشور است تا

References

1. Khongkhunthian P, Reichart PA. Aspergillois of the maxillary sinus as a complication of overfilling root canal material into the sinus: report of two cases. *J Endod* 2001; 27(7): 476-8.
2. Geiser DM, Klich MA, Frisvad JC, Peterson SW, Varga J, Samson RA. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2007; 59: 1-10.
3. Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*. 2nd ed. New York: Springer; 1997. p. 377-85.
4. Kamei K, Watanabe A. Aspergillus mycotoxins and their effect on the host. *Med Mycol* 2005; 43(Suppl 1): S95-S99.
5. Nielsen KF, Mogensen JM, Johansen M, Larsen TO, Frisvad JC. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395(5): 1225-42.
6. Sukanuma T, Fujita K, Kitahara K. Some distinguishable properties between acid-stable and neutral types of alpha-amylases from acid-producing koji. *J Biosci Bioeng* 2007; 104(5): 353-62.
7. Mirhendi H, Diba K, Kordbacheh P, Jalalvand N, Makimura K. Identification of pathogenic *Aspergillus* species by a PCR-restriction enzyme method. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 11): 1568-70.
8. Henry T, Iwen PC, Hinrichs SH. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4): 1510-5.
9. Kanbe T, Yamaki K, Kikuchi A. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. *Microbiol Immunol* 2002; 46(12): 841-8.
10. Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW, Holden DW. A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*.

- Mol Gen Genet 1995; 246(3): 353-9.
11. Kachuei R, Gerami Shoar M. Medical Mycology. Tehran: Baghiatallah University of Medical Sciences Press; 2006. [In Persian]
 12. Glass NL, Donaldson GC. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Appl Environ Microbiol 1995; 61(4): 1323-30.
 13. Bouakline A, Lacroix C, Roux N, Gangneux JP, Derouin F. Fungal contamination of food in hematology units. J Clin Microbiol 2000; 38(11): 4272-3.
 14. Kumeda Y, Asao T. Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section Flavi. Appl Environ Microbiol 1996; 62(8): 2947-52.
 15. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section Fumigati: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(4): 1244-51.
 16. Gonzalez-Salgado A, Patino B, Vazquez C, Gonzalez-Jaen MT. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section Nigri by PCR assays. FEMS Microbiol Lett 2005; 245(2): 353-61.
 17. Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. Med Mycol 2005; 43(Suppl 1): S207-S238.
 18. Balajee SA, Weaver M, Imhof A, Gribskov J, Marr KA. *Aspergillus fumigatus* variant with decreased susceptibility to multiple antifungals. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(4): 1197-203.
 19. Beuchat LR. Traditional fermented food products. In: Beuchat LR, editor. Food and Beverage Mycology. 2nd ed. New York: Springer; 1987. p. 224-53.
 20. Kong P, Hong CX, Tooley PW, Ivors K, Garbelotto M, Richardson PA. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. Lett Appl Microbiol 2004; 38(5): 433-9.
 21. Susca A, Stea G, Mule G, Perrone G. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. Food Addit Contam 2007; 24(10): 1154-60.
 22. Hong SB, Shin HD, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, et al. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section Fumigati. Antonie Van Leeuwenhoek 2008; 93(1-2): 87-98.
 23. Kocakaya YA, Coksoyler N. Heat-resistance characteristics of ascospores of *Eurotium chevalieri* isolated from apricot juice. Nahrung 2002; 46: 28-30.
 24. Gaur R, Singh R, Tiwari S, Yadav SK, Daramwal NS. Optimization of physico-chemical and nutritional parameters for a novel pullulan-producing fungus, *Eurotium chevalieri*. J Appl Microbiol 2010; 109(3): 1035-43.
 25. Kumar R, Sharma J, Singh R. Production of tannase from *Aspergillus ruber* under solid-state fermentation using jamun (*Syzygium cumini*) leaves. Microbiol Res 2007; 162(4): 384-90.
 26. Leitao J, Le BJ, Bailly JR. Production of aflatoxin B1 by *Aspergillus ruber* THOM and CHURCH. Mycopathologia 1989; 108(2): 135-8.

Morphological and Genotypic Identification of Some Environmental Isolates of *Aspergillus* in Iran Based on Beta-Tubulin Gene Sequencing

Gholamreza Shokohi¹, Hossein Mirhendi PhD², Parivash Kordbacheh PhD³, Mahnaz Nikaeen PhD⁴, Ali Rezaei-Matehkolaei PhD⁵, Mahdi Abastabar⁶

Abstract

Background: The genus *Aspergillus* is a mold consisting of various groups and species. Species identification of these fungi is important from pathogenic, toxigenic and industrial points of view. Conventional laboratory methods for delineation of *Aspergillus* species are based on macro- and microscopic characteristics of the colonies. These methods are time consuming and need expert technicians. The present study aimed to use beta tubulin (BT2) gene sequencing, in conjunction with morphological data, for species identification of *Aspergillus* strains isolated from some environments in Iran.

Methods: Totally, about 200 *Aspergillus* strains, isolated from soils and air samples of different environments including hospitals, public and natural places, were used. All isolates were subcultured on Sabouraud dextrose agar and Czapek Dox agar. They were preliminarily identified based on micro slide-culture. Genomic DNA was extracted from all strains by a conical grinder and BT2 gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from each sample. Among them, nucleotide sequences of 21 isolates, as representatives of morphologic features, were determined. The obtained data was analyzed via comparison with sequences existed in GenBank database.

Findings: Among the 21 *Aspergillus* sequenced isolates, seven isolates were identified as *Aspergillus flavus*, 3 as *Aspergillus fumigatus*, 3 as *Aspergillus chevalieri*, 2 as *Aspergillus tubingensis*, 2 as *Aspergillus niveoglacus*, 2 as *Aspergillus rubber*, one as *Aspergillus niger* and one as *Aspergillus versicolor*. Morphological results were confirmed by genotypic data.

Conclusion: The findings of this study indicated that sequencing beta tubulin gene is a valuable tool for species identification of *Aspergillus* environmental isolates. This method was found to be more valid in comparison with morphological analysis. Further studies with application of other genetic markers and molecular DNA-based procedures on discrimination of *Aspergillus* species are recommended.

Keywords: *Aspergillus*, Beta tubulin, Identification.

¹ MSc Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, National Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Medical Mycoparasitology, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁶ PhD Student, Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Hossein Mirhendi PhD, Email: mirhendi@tums.ac.ir