مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۶/هفته دوم بهمن ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۷

شناسایی مورفولوژیک و ژنوتیپیک برخی جدایه‌های آسپرژیلوس محیطی در ایران بر اساس توالی ژن بتا توبولین (β-tubulin)

غلامرضا شکوهی[۱]، دکتر سید حسین میرهندی[۲]، دکتر پریوش کردبچه[۳]، دکتر مهناز نیک آیین[۴]، دکتر علی رضایی مته کلایی[۵]، مهدی عباس تبار[۶]

چکیده

مقدمه: آسپرژیلوس‌ها جنس متنوعی از قارچ‌های رشته‌ای شامل گروه‌ها و گونه‌های متعدد هستند. شناسایی این قارچ‌ها از جنبه‌های مختلف مانند بیماری‌زایی، توکسین‌زایی و صنعتی حایز اهمیت است. روش‌های معمول آزمایشگاهی برای افتراق گونه‌های آسپرژیلوس شامل بررسی خصوصیات ظاهری و میکرو سکوپی کلنی می‌باشد. روش‌های فوق وقت گیر بوده و احتیاج به پرسنل مجرب دارد. هدف مطالعه‌ی حاضر، استفاده از تعیین توالی ژن بتا توبولین همراه با داده‌های مورفولوژیک برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس جدا شده از برخی محیط‌ها در ایران بود.

روش‌ها: در این مطالعه حدود ۲۰۰ سویه‌ی آسپرژیلوس جدا شده از خاک و هوای محیط‌های مختلف، اعم از بیمارستان و اماکن طبیعی و عمومی مورد استفاده قرار گرفتند. تمام ایزوله‌ها روی محیط‌های چاپکس آگار و سابورو کشت مجدد شدند و پس از کشت روی لام مورد شناسایی اولیه قرار گرفتند. DNAی ژنومی تمام ایزوله‌ها به روش خرد کردن با گرینر استخراج گردید و به دنبال آن ژن بتا توبولین (β-tubulin) هر یک از نمونه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction یا PCR) تقویت گردید و از بین آن‌ها ۲۱ ایزوله به عنوان نمایندگان خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی تعیین توالی گردیدند و داده‌های حاصل از طریق مقایسه با اطلاعات بانک ژن مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

یافته‌ها: از بین ۲۱ ایزوله‌ی آسپرژیلوس که تعیین توالی شدند، ۷ جدایه به عنوان آسپرژیلوس فلاووس (Aspergillus flavus)، ۳ جدایه آسپرژیلوس فومیگاتوس (A. fumigates)، ۳ جدایه آسپرژیلوس چوالیری (A. chevalieri)، ۲ جدایه آسپرژیلوس توبینژنسیس (A. tubingensis)، ۲ جدایه آسپرژیلوس نیوئوگلاکوس (A. niveoglacus)، ۲ جدایه به عنوان آسپرژیلوس روبر (A. ruber)، یک جدایه آسپرژیلوس نایجر (A. niger) و یک جدایه نیز به عنوان آسپرژیلوس ورسیکالر (A. versicolor) شناسایی شدند. یافته‌های مورفولوژی با نتایج ژنوتیپی تأیید گردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تعیین توالی ژن بتا توبولین برای شناسایی جدایه‌های محیطی آسپرژیلوس در سطح گونه بسیار با ارزش است و این روش، اعتبار بیشتری در مقایسه با بررسی ریخت شناسی جدایه‌ها دارد. استفاده از دیگر اهداف ژنتیکی و روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA برای مطالعه‌ی بیشتر گونه‌های آسپرژیلوس توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: آسپرژیلوس، بتا توبولین، شناسایی.

مقدمه

جنس آسپرژیلوس متشکل از حدود ۱۸۰ گروه و گونه ازقارچ‌های رشته‌ای است (۱). این قارچ‌ها متعلق به کلاس هیفومایست‌ها از شاخه‌ی دوترومایست‌ها است. با توجه به این که برخی از آن‌ها در مرحله‌ی جنسی تولید آسک و آسکوسپور می‌نمایند در شاخه‌ی

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت و مؤسسه‌ی ملی تحقیقات سلامت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۳] استاد، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
[۴] دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] استادیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۶] دانشجوی دکتری، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، دانشکده‌ی بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سید حسین میرهندی
Email: mirhendi@tums.ac.ir

آسکومیست‌ها قرار می‌گیرند (۲). آسپرژیلوس‌ها از جنبه‌های مختلف صنعتی، پزشکی و بیوشیمیایی حایز اهمیت هستند. تاکنون ۴۰ گونه از آن‌ها از عفونت‌های قارچی جدا شده‌اند که آسپرژیلوس فومیگاتوس، آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس نایجر، آسپرژیلوس ترئوس و آسپرژیلوس نیدولانس از آن جمله هستند (۳). علاوه بر این آسپرژیلوس‌ها در شرایط ویژه قدرت تولید و ترشح توکسین‌هایی همچون آفلاتوکسین، گلایوتوکسین، اکراتوکسین، پاتولین و سیترینین را دارند که از نظر بهداشت مواد غذایی و مسمومیت‌های حاد و مزمن حایز اهمیت هستند (۵-۴). آنزیم‌هایی نظیر آمیلاز و فراورده‌هایی با مصارف صنعتی نظیر اسید سیتریک، اسید بوریک و اسید لاکتیک توسط تعدادی از گونه‌های این جنس تولید می‌گردند (۶). نقش آسپرژیلوس‌ها در کنار سایر میکروارگانیسم‌ها در چرخه‌ی مواد معدنی بسیار بارز می‌باشد.

با توجه به اهمیت پزشکی و بیولوژیک آسپرژیلوس‌ها بدیهی است که شناسایی این گونه‌ها شرط لازم و ضروری برای انجام هر گونه مطالعه بر روی آن‌ها است. معیارهای مورفولوژیک با حداکثر دقت برای طبقه بندی و شناسایی گونه‌های جنس آسپرژیلوس به کار رفته و می‌رود، اما شناسایی این گروه عظیم قارچی با توجه به تفاوت‌های بسیار جزیی و ظریف آن‌ها بسیار وقت گیر بوده، مستلزم تجربه و مهارت زیادی می‌باشد. به علاوه صفاتی که در روش‌های مورفولوژیک جهت شناسایی گونه استفاده می‌شوند در واقع خصوصیات فنوتیپی هستند که تحت تأثیر شرایط محیطی نظیر دما و رطوبت ممکن است دستخوش تغییر شوند، در حالی که روش‌های مولکولی مبتنی بر تفاوت در توالی قطعات DNA، اغلب کمتر تحت تأثیر چنین عواملی قرار می‌گیرند؛ چرا که تنها تحت شرایط بسیار سخت و آن هم طی زمان طولانی امکان تغییرات بسیار جزیی در این مولکول‌ها وجود دارد. بنابراین این روش‌ها پایه و اساس مستحکم‌تری را برای اهداف شناسایی فراهم می‌آورند (۷). در سال‌های اخیر با ورود تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase chain reaction یا PCR) موفقیت‌های چشمگیری در تشخیص میکروارگانیسم‌ها بر پایه‌ی توالی DNA آن‌ها حاصل شده است. به تازگی با بررسی تشابه و اختلاف قطعات خاصی از مولکول DNA مثل ITS (۸)، DNA topoisomerease II (۹) و Chitin synthase (۱۰) و غیره روش‌های جدیدی برای شناسایی گونه‌های آسپرژیلوس معرفی شده است. مطالعات اولیه نشان می‌دهد که ژن کد کننده‌ی پروتئینی موسوم به بتا توبولین (β-tubulin) از پایداری و تنوع کافی برای افتراق گونه‌های مختلف قارچی از جمله آسپرژیلوس‌ها برخوردار است.

هدف این مطالعه، ارزیابی و استفاده‌ی عملی از ژن بتا توبولین در تشخیص و تعیین گونه‌ی سپرژیلوس‌های محیطی به روش PCR-sequencing و آن گاه مطالعه‌ی مورفولوژیکی سویه‌های جدا شده بود. این مطالعه مقدمه‌ی مناسبی برای بررسی‌های بیشتر در تشخیص آسپرژیلوس‌ها بود.

روش‌ها

جداسازی نمونه‌ها

این مطالعه از نوع توصیفی بود که به منظور ارزیابی کارایی عملی تعیین توالی ژن بتا توبولین در شناسایی دقیق ایزوله‌های آسپرژیلوس محیطی در سطح گونه

www.mui.ac.ir

انجام شد. در ابتدا حدود ۶۰۰ نمونه از خاک و هوای محیط‌های مختلف اعم از بیمارستان و اماکن طبیعی و عمومی جدا شد. برای جداسازی قارچ از خاک، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی کلرامفنیکل، جنتامایسین و سفتریاکسون به هر نمونه‌ی خاک در داخل لوله‌ی آزمایش اضافه و پس از ۲ ساعت مایع رویی از سطح لوله‌ها برداشته شد و پس از ورتکس و چند ثانیه سانتریفوژ، ۲۰۰ میکرولیتر از مخلوط به دست آمده توسط میکروپیپت استریل به محیط سابورو دکستروز آگار حاوی دی‌کلران (برای جلوگیری از رشد قارچ‌های گروه موکورال) منتقل و کلنی‌های مشکوک به آسپرژیلوس، جداسازی و نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ‌ها از هوا نیز از روش پلیت گذاری استفاده شد (۱۱).

استخراج DNA و تقویت ژن بتا توبولین

جهت استخراج DNA چند میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری جدایه‌ی آسپرژیلوس نگهداری شده، به پلیت حاوی محیط سابورو انتقال داده شد و کلنی ۳-۲ روزه، جهت جداسازی DNA مورد استفاده قرار گرفت. به ۳۰۰ میکرولیتر بافرلیز (حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار Tris، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl و ۲ درصد SDS)، قطعه‌ای در حدود ۱۰ میکرولیتر از کلنی آسپرژیلوس اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه توسط گریندر دستی الکتریکی خرد گردید. آنگاه حجم مساوی (۳۰۰ میکرولیتر) از محلول فنل کلروفرم به هر تیوب اضافه و مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه با دور g ۵۰۰۰ سانتریفوژ شد. پس از آن مایع رویی به تیوب جدید منتقل و حجم یکسان از محلول کلروفرم به آن اضافه و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ دوباره مایع رویی جدا گردید و مقدار ۰/۱ حجم استات سدیم ۳ مولار و حجم مساوی ایزوپروپانول به آن اضافه شد. پس از نگهداری به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی، این بار دور ریخته شد و حدود ۳۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه به رسوب اضافه و بعد از ۵ دقیقه سانتریفوژ، الکل، جداسازی و در نهایت بعد از خشک شدن رسوب در هوای آزاد، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به رسوب حاصل افزوده شد و مایع به دست آمده به عنوان محلول DNA خالص تا زمان لازم برای استفاده، در فریز ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جهت تقویت ژن بتا توبولین در PCR از پرایمرهای یونیورسال Bt2α (5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3') و (5' ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3') Bt2b استفاده شد (۱۲). مقدار ۵ میکرولیتر از DNAی استخراج شده، ۲۵ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۴۰۰ میکرو مولار مخلوط dNTP، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار کلرورمنیزیم، ۲/۵ واحد تک پلی‌مراز و مقدار لازم آب مقطر دیونیزه‌ی استریل تا رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر افزوده شد و در دستگاه ترمال سیکلر قرار داده شد. برنامه‌ی حرارتی به صورت یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل ۷۲ درجه به مدت ۶ دقیقه تنظیم شد. جهت رؤیت نتیجه‌ی واکنش، ۷ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر از بافر بارگذاری مخلوط و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و درون تانک حاوی بافر (شامل Tris، Boric acid و EDTA) TBE الکتروفورز شد. ژل‌ها

www.mui.ac.ir

بـه دسـتگاه تـرانس ایلومینـاتور منتقـل و از بانـدها عکسبرداری به عمل آمد. بعد از انجـام PCR و تکثیـر ناحیه‌ی بتا توبولین، بر اسـاس تفـاوت و یـا تشـابه در مورفولوژی ماکروسـکوپی و میکروسـکوپی، کلنـی‌هـا گروه بنـدی شـدند و سـپس از محصـولات PCR ۲۱ ایزولـه، بـه عنـوان نماینـدگان گـروه‌هـای مختلـف 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 نمونـه‌هـا بـا نـرم‌افـزار MEGA 4 (MEGA (version 4, Tamura, Dudley, Nei, and Kumar 2007 ویرایش شد و بدین ترتیب سکانس نهایی بتا توبـولین هر ایزوله به دست آمد. توالی‌ها، با استفاده از نرم‌افـزار BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) با توالی‌هـای مشـابه در بانـک ژن (GenBank) مـورد مقایسه و آنالیز قرار گرفتند. شناسـایی ایزولـه‌ی مـورد نظـر در صـورت وجـود تشـابه تـوالی بـالا (۱۰۰-۹۹ درصد) با یک یا بیش از یک تـوالی قابـل اطمینـان از یک گونه‌ی شناخته شـده در پایگـاه داده‌هـای NCBI انجام شد.

یافته‌ها

از مجموع ۶۰۰ ایزوله‌ی قارچی که از خـاک و هـوای محیط‌های مختلف اعم از بیمارستان و اماکن طبیعـی و عمـومی جـدا گردیـد، ۱۹۶ ایزولـه مشـکوک بـه آسـپرژیلوس بـود. مشخصـات میکروسـکوپی و ماکروسکوپی این ایزوله‌ها مورد بررسی قرار گرفـت و به چند گروه مورفولوژیک تقسیم گردید. از هـر کـدام از این گروه‌ها یک یا چند نماینده انتخـاب و عملیـات مولکولی روی آن‌ها انجام شد.

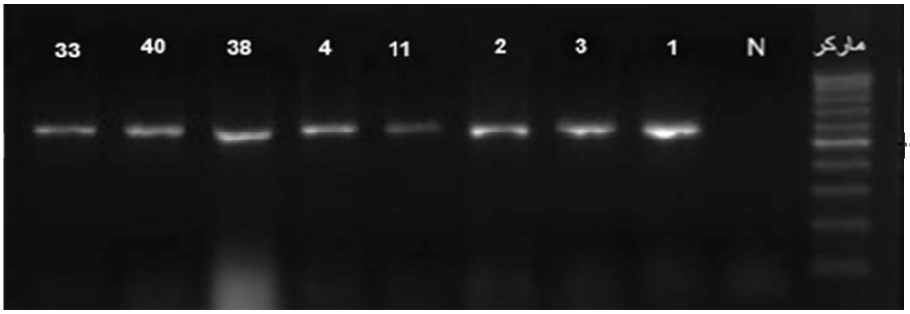
در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، ناحیه‌ی بتا توبـولین کلیه‌ی نمونه‌ها با موفقیت تقویت گردید و برای تمامی ایزوله‌ها یک باند به اندازه‌ی تقریبی ۵۷۰-۵۴۰ جفـت باز مشاهده گردیـد. شـکل ۱ نمونـه‌ای از الکتروفـورز محصـولات PCR ژن بتـا توبـولین مربـوط بـه چنـد جدایه‌ی آسپرژیلوس را نشان می‌دهد. چنانچه ملاحظه می‌شود ژن بتا توبولین در آسپرژیلوس‌ها دارای باند با وزن تقریبی مساوی می‌باشد.

در جدول ۱، نتایج تعیین توالی ژن بتـا توبـولین از چند نمونه‌ی آسپرژیلوس جدا شده در این مطالعه، بـه عنـوان نماینـدگان گـروه‌هـای مختلـف مورفولوژیـک ملاحظه می‌شود. تمام نمونه‌ها دارای ۱۰۰-۹۹ درصـد تشابه سکانس با نمونه‌های استاندارد موجود در پایگاه داده‌ای NCBI می‌باشند.

بدین ترتیب از ۲۱ نمونه‌ای که تعیین توالی شـدند، ۷ ایزوله به عنوان آسپرژیلوس فلاووس، ۳ ایزولـه بـه عنوان آسپرژیلوس فومیگاتوس، ۳ ایزوله آسـپرژیلوس چـوالیری، ۲ ایزولـه آسـپرژیلوس روبـر، ۲ ایزولـه آسـپرژیلوس نیوگلاکـوس، ۲ ایزولـه آسـپرژیلوس توبینژنسیس، ۱ ایزوله آسپرژیلوس نـایجر و ۱ ایزولـه نیز به عنوان گونه‌ی آسپرژیلوس ورسـیکالر تشـخیص داده شد. پس از معلوم شدن ماهیت جدایه‌ها در سطح گونه از طریق تعیین توالی، به طور مجـدد بـه بررسـی دقیق نمونه‌ها از لحاظ ریخت شناسی میکروسـکوپی و انطباق این نتایج با نتـایج مولکـولی پرداختـه شـد. بـا توجـه بـه متـون موجـود در ایـن زمینـه مشخصـات میکروسـکوپی و ماکروسـکوپی تمـام ۲۱ ایزولـه بـا ویژگی‌های گونه‌ای که توسط Sequencing معین شده بود، به طور کامل تطابق داشتند.

شـکل ۲ تصـویر منـاظر میکروسـکوپی برخـی

www.mui.ac.ir



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

ایزوله‌های آسپرژیلوس را که نمایندگان گروه‌های مورفولوژیک مختلف در مطالعه بودند، نشان می‌دهد.

در شکل ۱-۲ منظره‌ی ریزبینی ایزوله‌ی آسپرژیلوس شماره‌ی ۱۱ که با تعیین توالی به عنوان آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس نایجر شناسایی شد، ملاحظه می‌شود. کونیدیوفور صاف و فاقد دیواره‌ی عرضی، وزیکول کروی، فیالاید دو ردیفه و کونیدی کروی سیاه رنگ از مشخصات این گونه است. شکل ۳-۲ ساختار میکروسکوپی آسپرژیلوس شماره‌ی ۳۳ را که با تعیین توالی به عنوان آسپرژیلوس فلاووس 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 ریزبینی جدایه‌ی شماره‌ی ۳ است که با تعیین توالی به عنوان آسپرژیلوس فومیگاتوس شناسایی شد و دارای کونیدیوفور صاف، فیالاید یک ردیفه، وزیکول بطری شکل، کونیدی کروی شکل و آرایش کونیدی به صورت ستونی می‌باشد.

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

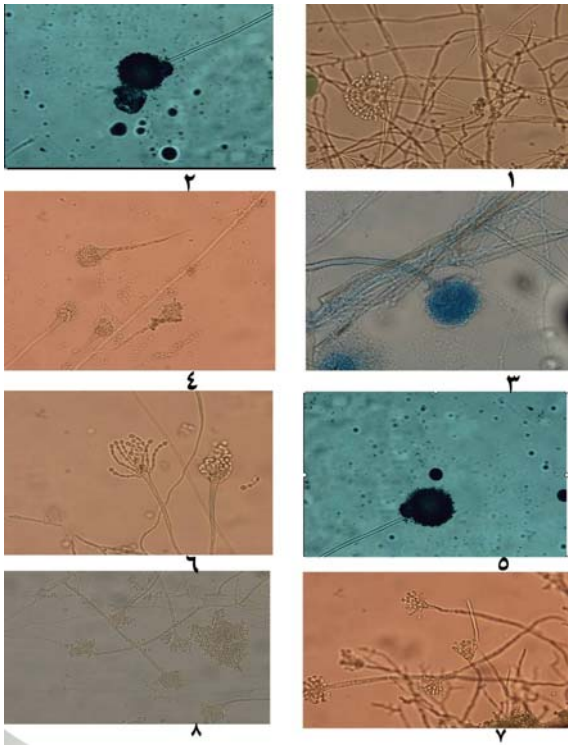
شماره‌ی نمونه‌ها	میزان همپوشانی ناحیه آنالیز شده در Blast	گونه‌ی آسپرژیلوس واجد بیشترین تشابه	میزان تشابه (درصد)
۶، ۱۱	۱۰۰	آسپرژیلوس روبر	۱۰۰
۴، ۵، ۱۴	۱۰۰	آسپرژیلوس چوالیری	۱۰۰
۳، ۳۰، ۳۴	۱۰۰	آسپرژیلوس فومیگاتوس	۱۰۰
۲، ۱۰	۱۰۰	آسپرژیلوس نیوگلاکوس	۹۹
۱	۱۰۰	آسپرژیلوس ورسیکالر	۹۹
۱۲، ۱۳، ۱۵، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۷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

www.mui.ac.ir

شکل ۵-۲ نیز نمای میکروسکوپی آسپرژیلوس شماره‌ی ۳۸ را که در تعیین توالی آسپرژیلوس توبینژنسیس 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 آسپرژیلوس 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 آسپرژیلوس 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 ریزبینی آسپرژیلوس شماره‌ی ۱ است که در تعیین توالی، آسپرژیلوس ورسیکالر شناسایی شد و دارای کوفیدیوفور صاف، وزیکول کروی، فیالاید دو ردیفه، کونیدی کروی شکل و آرایش شعاعی کونیدی‌ها می‌باشد.

بحث

آسپرژیلوس‌ها 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 آسپرژیلوس به بخش‌های مختلف تقسیم شده است که هر بخش



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

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

آسپرژیلوس‌ها قارچ‌هایی با ماهیت دو گانه (مفید و یا به ظاهر مضر) هستند. برخی از آن‌ها پاتوژن هستند و در انسان و حیوان عفونت‌هایی نظیر آسپرژیلوزیس ریوی و مهاجم، مایستوما، کراتیت و اتومایکوزیس ایجاد می‌کنند؛ به طوری که از ۱۸۰ گونه‌ی آسپرژیلوس که تاکنون توصیف شده است، حدود ۴۰ گونه از عفونت‌های قارچی انسانی جدا شده‌اند (۱۸-۱۷). از سوی دیگر، آسپرژیلوس‌ها 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

www.mui.ac.ir

داروی لووستاتین که از آسپرژیلوس ترئوس و یا داروی سیلوفانژین که از تغییرات شیمیایی اکینوکاندین 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 DNAی 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 ریزبینی، به عنوان آسپرژیلوس نایجر شناخته می‌شوند در واقع متعلق به ۲ گونه‌ی مجزا و غیرقابل افتراق از لحاظ مرفولوژی یعنی آسپرژیلوس نایجر و آسپرژیلوس توبینژنسیس 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 آئروبازیدیوم پولولانس رقابت می‌کند و به دلیل تولید مقادیر بالای پولولان استفاده‌ی صناعی 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

www.mui.ac.ir

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 بدین‌وسیله 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. بدین‌وسیله 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.

References

1. Khongkhunthian P, Reichart PA. Aspergillosis 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. Suganuma 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, Jalalizand 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.

www.mui.ac.ir

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 Pesian]
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.

www.mui.ac.ir

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 166, 2nd week, Februray 2012 Received: 26.7.2011 Accepted: 9.10.2011

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

Gholamreza Shokohi[1], Hossein Mirhendi PhD[2], Parivash Kordbacheh PhD[3], Mahnaz Nikaeen PhD[4], Ali Rezaei-Matehkolaei PhD[5], Mahdi Abastabar[6]

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 Czapec 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