تنوع زایموگرافی پکتیناز در قارچهای *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus*

غلامرضا بلالی[1*] ، امیر عباس مینایی فر[1] و بهرام شریف نبی[2]

[1] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

[2] اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۸٤/۷/۱۰ تاریخ پذیرش:۸۵/۵/۱۵

چکیده

جنس *Aspergillus* از دسته قارچهای ناقص و با تنوع گونه‌ای فراوان است. برخی از گونه‌های این قارچ باعث آلودگی در انسان، حیوان، گیاه و خشکبار می‌گردند. اکثر گونه‌های *Aspergillus* به واسطه تولید آنزیم پکتیناز توانایی تجزیه مواد گیاهی را دارند. از گونه‌های مهم این جنس می‌توان به دو گونه *Aspergillus flavus* و *A. niger* اشاره نمود. هرچند با استفاده از روشهای معمول ریخت شناسی تفاوتهای بین این دو گونه *Aspergillus* را می‌توان تعیین نمود، ولی این روشها نمی‌تواند نمایانگر تنوعهای درون گونه‌ای باشد. از آنجا که این دوگونه قادر به ترشح آنزیم پکتیناز می‌باشند، لذا در این مطالعه از روش پکتیک زایموگرام بعنوان روشی ساده و کارآمد برای آشکار ساختن این تفاوتها استفاده شد. در این بررسی ابتدا نمونه‌های غذایی، محصولات کشاورزی و غیره جهت جداسازی قارچ به محیطهای کشت انتقال داده شد. سپس قارچهای *Aspergillus* بدست آمده خالص‌سازی و بر اساس صفات ظاهری مورد شناسایی قرار گرفتند. در این راستا ٤٠ جدایه *A. niger* و ۳۰ جدایه *A. falvus* شناسایی گردید. سپس نمونه‌های خالص را تحت شرایط استریل به محیط کشت مایع انتقال داده و سیتروس پکتین بعنوان تنها منبع کربن در این محیط باعث القای ترشح آنزیم خارج سلولی پکتیناز توسط قارچ گردید. پس از انکوباسیون نمونه‌های یاد شده، پکتیناز ترشح شده از آنها استخراج و تغلیظ شد و در ژل پلی‌اکریل آمید افقی الکتروفورز گردید. حاصل الکتروفورز به دست آمدن ۱۸ الگوی زایموگرام برای *A. niger* و ۸ الگو برای *A. flavus* بود. با بررسی الگوهای آنزیمی حاصله از روش الکتروفورزی پکتیک زایموگرام مربوط به دوگونه مذکور علاوه بر مشاهده اختلافات بین گونه‌ای، تفاوتهای درون گونه‌ای نیز بوضوح قابل تشخیص بود. با استفاده از این روش علاوه بر شناسایی گونه ها و تنوع درون و بین گونه ای می توان اپیدمیولوژی این قارچها را نیز مورد مطا لعه قرار داد.

واژه‌های کلیدی: *Aspergillus flavus* ، *Aspergillus niger* ، پکتیک‌زایموگرام

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۹۱۳۱۱۵۰۹٤۳، پست الکترونیکی: rbalali@sci.ui.ac.ir

مقدمه

جنس *Aspergillus* از دسته قارچهای ناقص و با تنوع گونه‌ای فراوان است (**۱۳**). شناسایی گونه‌های این قارچ از ابتدا با پیچیدگیهایی همراه بوده است، از جمله عواملی که در ایجاد این پیچیدگی دخالت دارند می‌توان بتعداد گونه‌های موجود در این جنس اشاره کرد. بطوریکه برای این جنس تا کنون بیش از ۱۵۰ گونه شناسایی شده است. مهمترین عاملی که شناسایی گونه‌های این قارچ بویژه گونه‌های مربوط به یک بخش را مشکل می‌سازد (براساس نظر Kilch و Pitt این جنس به ٦ زیر جنس تقسیم می‌شوند که هر کدام از این زیر جنسها شامل یک یا چند بخش است)، تشابه زیاد صفات و همچنین همپوشانی شدید آنها با یکدیگر است (۱۳). گونه‌های مختلف آسپرژیلوس با دارا بودن میزبانهای متعدد و متفاوت از بعضی جهات بعنوان قارچی مفید و از جهات دیگر بعنوان

Archive of SID

www.SID.ir

یک قارچ مخرب شناخته می‌شوند (۱۳). از موارد مفید بودن آسپرژیلوس می‌توان به استفاده از گونه‌های مختلف این قارچ در صنایع غذایی، چوب، کاغذ و نساجی اشاره کرد (۲٦). تعدادی از گونه‌های این جنس باعث آلودگی محصولات کشاورزی مانند پسته، ذرت و دیگر تولیدات زراعی شده و علاوه بر تخریب کیفیت محصولات کشاورزی باعث مسمومیت و سرطانزایی در سایر موجودات از جمله انسان می‌گردد(۱۷). بدلیل اهمیت این قارچ در زندگی انسان چه از جنبه‌های مثبت و چه از جنبه‌های منفی آن شناسایی گونه‌های مختلف این قارچ حائز اهمیت است. برای تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس بطور معمول از مشخصات ظاهری شامل صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ و میزان رشد کلنی و صفات میکروسکوپی مانند مورفولوژی و اندازه گیری وزیکول (Vesicle)، کنیدی (Conidia)، کونیدیوفور (Conidiophor)، فیالید (Phialide) و متولا (Metula) استفاده می‌شود (۲۰). نکته مهمی که در اینجا وجود دارد این است که گونه‌های آسپرژیلوس دارای تغییر پذیری ظاهری وابسته به شرایط محیط رشد هستند بعلاوه صفات ریخت شناسی معرفی شده برای گونه‌های مختلف از لحاظ اندازه و حالت همپوشانی، شباهتهای بسیار زیادی بهم دارند (۱۳). همچنین برای تمایز گونه‌های این قارچ نیاز به شرایط کنترل شده و محیطهای کشت استاندارد مختلفی است که هزینه بر و وقت گیر می‌باشد و در نهایت از دقت بالایی نیز برخوردار نیست بهمین دلیل از ابتدای شناسایی این قارچ کلیدهای شناسایی متعددی ارائه گردیده که هر یک دارای ابهاماتی می‌باشد (۲۰).

نیاز به صرف وقت زیاد جهت تهیه محیطهای کشت استاندارد برای داشتن کلیه ویژگیها و کاهش تأثیر عوامل محیطی، ناپایداری برخی از صفات و همپوشانی بسیاری از ویژگیهای بین گونه‌های مختلف این قارچ سبب شده است که کوششهایی جهت شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌های آسپرژیلوس با کمک روشهای مولکولی صورت گیرد. اما تا کنون مطالعه‌ای روی الگوهای آنزیمی پکتیناز این قارچها صورت نگرفته است. نظر به اینکه اکثر گونه‌های آسپرژیلوس توانایی تولید این نوع آنزیم را دارند (۲٦)، در این بررسی علاوه بر بررسی ویژگیهای مرفولوژی برای تفکیک گونه‌ها از روش زایموگرم (Zymogram) استفاده گردید که الگوی الکتروفورزی حاصل از آنزیمهای پکتیک خارج سلولی را مورد مقایسه قرار می‌دهد.

در بین گونه‌های آسپرژیلوس، دو گونه *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* از گونه‌هایی هستند که به فراوانی در طبیعت یافت می‌شوند. این دو گونه از قارچهای اصلی آلوده کننده مواد غذایی و محصولات کشاورزی هستند که از دلایل آن توانایی *A. niger* و *A. flavus* درترشح آنزیم پکتیناز می‌باشد(۵، ۱۲، ۲۱، ۲٤و ۲٦). با توجه به اینکه با استفاده از روشهای شناسایی معمول ریخت‌شناسی و میکروسکپی نمی‌توان تفاوتهای درون گونه‌ای موجود در جدایه های *A. niger* و *A. flavus* جدا شده از مواد و منابع مختلف را مشخص نمود در این بررسی سعی شد با استفاده از مشخصات مورفولوزیکی و روش الکتروفورز آنزیمی پکتیک‌زایموگرام تنوع درون گونه‌ای موجود در جدایه های *A. niger* و *A. flavus* جدا شده از منابع مختلف از جمله خاک، خشکبار، غذای طیور و محصولات کشاورزی تعین گردد. این روش پیشتر در ایران برای قارچهای مختلف از جمله *Rhizoctonia Fusarium* و *Penicillium* و.بکارگرفته شده است (۲ و ۷). در این مطالعه تنوع درون گونه ای وبین گونه ای موجود در جدایه های *A. niger* و *A. flavus* مورد بررسی قرار گرفت. به نظر می رسد از طریق بررسی تنوع ایزوزایمی علاوه بر شناسایی گونه بتوان اپیدمیولوژی قارچ را تعین نمود.

مواد و روشها

نمونه‌برداری و جداسازی: با توجه به طیف وسیع پراکنش این دوگونه از قارچ *Aspergillus*، نمونه‌هایی شامل مواد غذایی، خاک، گیاهان بیمار و محصولات زراعی مشکوک

Archive of SID

www.SID.ir

به آلودگی با آسپرژیلوس جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس بخشهای آلوده به کپک تحت شرایط استریل و در کنار شعله به پتری های حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) خریداری شده از شرکت Oxiod منتقل شد و بعد از آن تشتکهای مذکور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در تاریکی نگهداری شدند.

تهیه کشت خالص آسپرژیلوس: پس از ۲٤ تا ٤۸ ساعت قارچهای رشد یافته زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و پرکنه هایی که ویژگیهای *Aspergillus* را نشان دادند با استفاده از روش کشت نوک ریسه (Hyphal tip culture) به محیط کشت جدید PDA منتقل و خالص سازی شد.

بررسی‌های ریخت شناسی: جدایه ها از نظر ویژگیهای ماکروسکوپی و میکروسکپی مورد بررسی قرار گرفتند، برای شناسایی گونه از محیطهای کشت اختصاصی ویژه آسپرژیلوس شامل CYA (Czapek Yeast Extract Agar)، CYA20s (Czapek Yeast Extract Agar with 20% sucrose) و MEA(Malt Yeast Extract) تهیه شده از کمپانی مرک(Merk) استفاده شد. پس از کشت خالص شده در محیط های مذکور یک محیط CYA در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و محیط دیگر CYA بهمراه MEA و CYA20s در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بمدت یک هفته در تاریکی و درون انکوباتور نگهداری شدند.

صفات ماکروسکوپی و صفات میکـــروسکوپی جدایه های حاصل با استفاده از کلـــیـدهای شناسایی (۱۳و۱۹) مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که ویژگـیهای ماکروسکوپی شامل میزان رشد و قطر کلنی(میانگین قطر ۳ کلنی در هر ظرف کشت) و رنگ کلنی از دو سطح زیرین و زبرین یادداشت شد، برای بررسی ویژگـــیهای میکروسکوپی ابتدا قارچها را بمدت ۳ روز روی محیط کشت آب آگار (Water Agar) قرارداده سپس از آن لام تهیه گردید و با استفاده از لنز چشمی مدرج و میکروسکوپ با بزرگ نمایی ٤۰۰ و ۱۰۰۰ شکل، اندازه و تزئینات کنیدیها (بطور میانگین ۱۵ کنیدی)، طول و عرض پایه (بطور میانگین ۱۰ پایه)، اندازه وزیکول (بطور میانگین ۱۰ وزیکول) و دو ردیفی و یا یک ردیفی بودن آنها، طول و عرض فیالید (Phialide) و متولا (Metulae)(بطور میانگین ۱۰ عدد از هرکدام) مورد بررسی قرار گرفت.

ایجاد شرایط القایی ترشح آنزیم پکتیناز (Pectinase): به ظروف شیشه‌ای کوچکی(Bijoax Bottle) حاوی ۳ یا ۲ میلی لیتر محیط کشت مایع محتوی سیتروس پکتین (Citrus Pectin)بعنوان تنها منبع کربن با pH برابر ۵/۵ یک بلوک آگار به قطر ۵ تا ۱۰ میلیمتر محتوی ریسه قارچ از مناطق حاشیه‌ای و در حال رشد کلنیهای مختلف *Aspergillus* منتقل شد. محیطهای کشت بمدت ۱۱ تا ۱۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی و در حالت سکون قرار داده شد سپس به آرامی و بدون آسیب رساندن به میسلیومها بمنظور جلوگیری از مخلوط شدن آنزیمهای پکتیناز درون سلولی با آنزیمهای پکتیناز برون سلولی به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر مایع زیر ریسه از هر یک از محیطهای کشت مورد نظر برداشت و با ۰/۰۱ گرم سفادکس(Sephadex G-200) مخلوط و بمدت ۳۰ دقیقه قبل از الکتروفورز در دمای اتاق نگهداری شد(۱٦).

بهینه سازی شرایط القاء ترشح پکتیناز: برای بدست آوردن مناسب‌ترین الگو، شرایط بهینه برای گونه‌های مختلف بدست آمد به این منظور برای برخی از گونه‌ها شرایط متفاوتی فراهم شد بطور مثال میزان محیط کشت مایع در نظر گرفته شده برای *A. niger* سه میلی‌لیتر(۱ میلی لیتر بیشتر از *A. flavus*) و برای برخی نمونه‌ها از گونه *A. flavus* که رشد کندتری داشتند زمان طولانی‌تری جهت رشد در محیط مایع در نظر گرفته شد، همچنین میزان قارچ انتقال یافته از محیط PDA به محیط کشت مایع نیز برای برخی نمونه های گونه *A. flavus* دو برابر حد معمول(بلوک به قطر ۱۰ میلی متر) بود. (جدول ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- بهینه سازی شرایط القا ترشح آنزیم پکتینازجهت بدست آوردن الگوی مناسب زایموگرمی

گونه	مدت رشد در کشت‌مایع(روز)	حجم کشت مایع (میلی لیتر)	قطر کلنیهای منتقل شده ازPDA به کشت مایع(میلیمتر)
A. flavus	۱۳-۱۷	۲	۵ -۱۰
A. niger. var.*awamori*	۱۱	۳	۵
A. niger. var. *niger*	۱۱	۳	۵

الکترفورز: برای انجام الکتروفورز روش Cruickshank and Wade (۱۰) بکار گرفته شد. هر یک از چاهکهای ژلهای پکتین آکریل آمید(Pectin-acrylamide gels) افقی با ۱۰ میکرولیتر از محلول تهیه شده (مخلوط مایع زیر ریسه با سفادکس) پر شد،۳ میکرو لیتر برموفنل‌بلو (۵ درصد) بعنوان نشانگر به چاهک اول و آخر ژل اضافه گردید. ژل به تانک الکتروفورز افقی حاوی ۱ لیتر بافر تانک منتقل شد، در این تانک از فتیله‌هایی پارچه‌ای جهت برقراری ارتباط بین قطبهای مثبت و منفی دستگاه استفاده شد. شدت جریان روی ١٦ میلی آمپر تنظیم گردید و تا پایان الکتروفورز ثابت نگهداشته شد در طی مدت انجام الکتروفـــوز دمای صفحه فلزی زیر ژل با عبور آب سرد ٦ درجه توسط دستگاه Thermostatic Circulator(LKB 221) سرد نگهداشته شد. هنگامی که نشانگر بروموفنل بل به ۵ سانتیمتری انتهای ژل رسید که برابر گذشت زمانی حدود ۳ ساعت بود جریان الکتروفورز قطع گردیده و ژل بمدت ۱/۵ ساعت در محلول DL- مالیک اسید (DL-Malic Acid) 1/0 مولار در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. اسید مالیک pH متغیری را برای فعال شدن ایزوزیمهای موجود در ژل ایجاد می‌کند سپس ژل با آب مقطر شسته شده و بمدت ۱۸ ساعت در محلول Ruthenium red (۰/۲)گرم در لیتر در دمای ۵ درجه سانتی گراد روی همزن درون یخچال قرار گرفت. روتینیوم رد باعث قرمز شدن پکتین موجود در ژل می‌شود در نتیجه در نواحی که ایزوزیمهای پکتیناز روی پکتین اثر کرده باشند رنگی متفاوت با رنگ زمینه ژل بوجود می‌آورند که در نتیجه باعث مشخص شدن الگوهای باندهای آنزیمی می‌گردد، پس از شست و شوی ژل با آب مقطر استریل، بمدت ۲۰ دقیقه ژل در محلول آمونیوم پر سولفات ۰/۰۵ درصد در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت این عمل سبب افزایش وضوح باندهای ایجاد شده روی ژل در هنگام تهیه عکس می‌شود. پس از شستشوی ژل با آب مقطر از ژل عکس تهیه گردید.

نتایج

تعداد زیادی جدایه از مواد غذایی، خاک، گیاهان دارویی خشک و هرباریومی و گیاهان بیمار تهیه شد، در نهایت تعداد۷۰ جدایه که ویژگی‌های *A. flavus* و *A. niger* را نشان می‌دادند نگهداشته شده و بقیه حذف گردید تعداد جدایه‌های *A.niger* با دو واریته *awamori* (۱۷جدایه) و *niger* (۲۳جدایه) بیش از جدایه‌های *A. flavus* بود.

شرح گونه‌ها:

گونه *A. flavus* Link :

ویژگیهای ماکروسکپی: پس ازگذشت هفت روز از انتقال جدایه به محیطهای کشت CYA MEA, و CY20S، میانگین قطر کلنی روی محیط کشت های CY20s و CYA، 65 میلیمتر، رنگ سطح زبرین سبز زیتونی یا زیتونی مایل به زرد میسلیومها سفید، ترشحات بی رنگ تا قهوه‌ای، سطح زیرین بی رنگ تا قهوه‌ای پر رنگ. میانگین قطر کلنی

Archive of SID

www.SID.ir

روی MEA 45، میلیمتر و رنگ سطح بالایی سبز مایل به خاکستری، سطح زبرین بی رنگ و میانگین رشد کلنی در ۳۵ درجه سانتی گراد ٦۰ میلیمتر بود.

ویژگی‌های میکروسکوپی: وزیکولها بطور عمده دو ردیفه، میانگین قطر وزیکولها ۲۵-۲۸ میکرومتر و متولاها سه چهارم تا تمامی سطح آن را می‌پوشانند، اندازه متولا ۵×۸ میکرومتر، و اندازه فیالیدها ٤×۱۰ میکرومتر. کنیدیها گرد تا بیضوی به قطر میانگین ۳/۹ با دیواره‌های صاف رویت شد.

وجوه تمایز: رنگ سبز-زرد کلنیها، وجود کنیدیهایی به قطر ۳ تا ٦ میکرومتر با دیواره‌های صاف یا کمی زبر که مورد اخیر از وجوه تمایز این گونه با گونه *A. parasiticus* می‌باشد. منبع جداسازی این گونه مواد غذایی، گیاهان بیمار، غذای طیور و...بود.

گونه *A. niger* var. *awamori* Al-Musallam:

ویژگی‌های ماکروسکوپی: پس ازگذشت هفت روز از انتقال جدایه به محیطهای کشت CYA MEA, و CY20S، میانگین قطر کلنی روی CYA 65 میلیمتر، رنگ سطح بالایی سیاه، ریسه‌ها سفید تا زرد، سطح زیرین قهوه یا زرد تیره، میانگین قطر کلنی روی CY20S 70 میلیمتر و بقیه صفات مشابه CYA، قطر کلنی روی MEA 60 میلیمتر و رنگ هر دو سطح مشابه CYA.

ویژگی‌های میکروسکوپی: وزیکولها بطور عمده دو ردیفه، قطر میانگین وزیکول‌ها ۳۵ میکرومتر اندازه متولاها ۵×۱۰ میکرومتر، اندازه فیالیدها ۳×۸ میکرومتر، کنیدیها گرد با دیواره‌های صاف یا با زبری بسیار اندک با میانگین قطر ٤/۲-۳/۹ میکرومتر تعیین شد.

وجوه تمایز: رنگ سیاه کلنی، دو ردیفه بودن وزیکولها و همچنین صاف بودن یا زبری کم دیواره‌های کنیدیها. از وجوه تمایز این گونه محسوب می شد. منبع جداسازی این گونه خاک، هوا، مواد غذایی و خشکبار و ... .بود.

گونه *A. niger var niger* Al-Musallam

ویژگیهای ماکروسکوپی: پس ازگذشت هفت روز از انتقال جدایه به محیطهای کشت CYA MEA, و CY20S، میانگین قطر کلنی روی CYA، 65 میلیمتر و رنگ سطح زبرین کلنی سیاه، ریسه‌ها سفید تا زرد پر رنگ، سطح زیرین بی رنگ تا زرد. قطر کلنی روی CY20S 70 میلیمتر و بقیه صفات مشابه CYA، میانگین قطر کلنی روی MEA 60 میلیمتر و رنگ سطح زیرین سیاه، ریسه‌ها سفید، سطح زیرین کلنی بی‌رنگ، قطر میانگین کلنی در دمای ۳۵ درجه ٦۰ میلیمتر بود.

ویژگی‌های میکروسکوپی: وزیکول‌ها غالباً دو ردیفه، با قطر میانگین ۵۰ میکرومتر متولا تمامی سطح وزیکول را می‌پوشاند، میانگین اندازه متولا ٦×۱۲ و اندازه فیالیدها ۳×۷ میکرومتر کنیدی‌ها گرد، اغلب بسیار زبر و با میانگین قطر میانگین ۳/۹-۳/۵ میکرومتر بود.

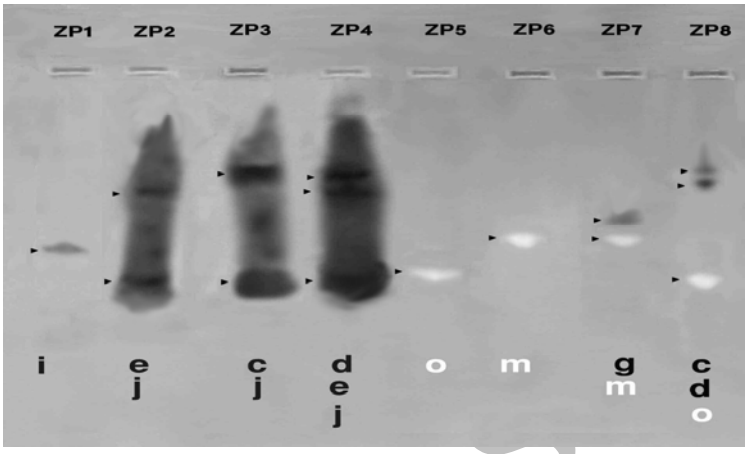
وجوه تمایز: رنگ سیاه کلنی، بزرگی وزیکول‌ها. وجه تمایز اصلی این واریته با واریته *awamori* در زبری زیاد کنیدی‌های واریته *niger* است. از نام های مترادف این گونه می توان به *A. tabingensis, A. ficuum* اشاره کرد. منبع جداسازی این گونه خاک، هوا، مواد غذایی، گیاهان خشک و بیمار و... است.

بررسی الگوهای آیزوزایمی: تعداد ۷۰ جدایه آسپرژیلوس بدست آمد از میزبانهای مختلف با روش الکتروفورز پکتیک‌زایموگرام مورد بررسی قرار گرفت. الگوهای حاصل از این ۷۰ جدایه مورد آزمایش براساس شباهت الگوهای آیزوزایمی در ٤۵ فنوتیپ گروه‌بندی شد، آیزوزایمهای پلی‌گالاکتوروناز (Polygalacturonase) و پکتین استراز (Pectin esterase) بصورت مجزا یا با هم در گونه‌های مختلف دیده شد. در جدایه‌های مورد آزمایش ۲٦ الگوی زایموگرام (Zymogram Pattern) شناسایی شده که از ZP_1 تا ZP_{26} نامگذاری شد. بطور کلی در تجزیه و تحلیل

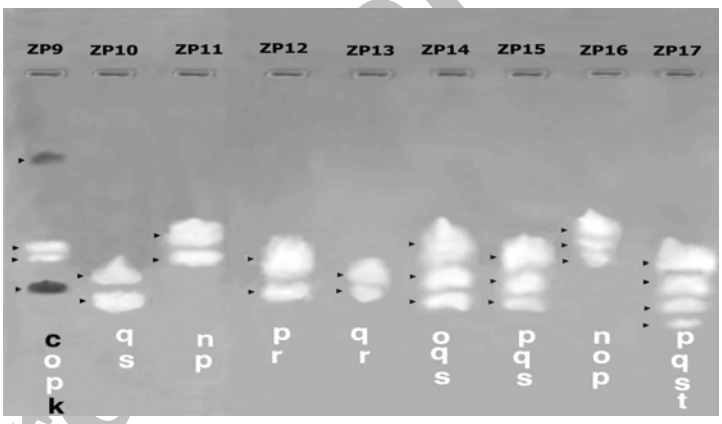
Archive of SID

www.SID.ir

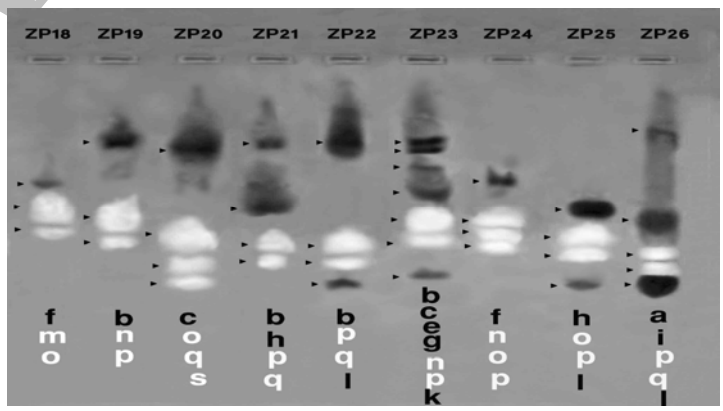
الگوی الکتروفورزی ۲۰ باند شناسایی که با حروف انگلیسی نامگذاری شد، حروف a تا l مربوط به آیزوزیمهای پلی‌گالاکتوروناز و حروف m تا t مربوط به آیزوزایمهای پکتین استراز،در عکس باندهای سیاه نشان دهنده فعالیت پلی‌گالاکتوروناز و باندهای سفید نشان دهنده فعالیت پکتین استراز است (شکل ۳،۲،۱).



شکل ۱- الگوهای زایمو گرمی بدست آمده از *Aspergillus flavus*



شکل ۲- الگوهای بدست آمده از *Aspergillus niger* var. *awamori* و *Aspergillus niger* var. *niger*



شکل ۳- الگوهای بدست آمده از *Aspergillus niger* var. *awamori* و *Aspergillus niger* var. *niger*

www.SID.ir

الگوهای زایموگرمی بدست آمده از ZP_1 تا ZP_8 متعلق به گونه *A .flavus* بوده و الگوهای $ZP_{21}, ZP_{19}, ZP_{17}, ZP_{15}$, ZP_{13}, ZP_{12} مربوط به گونه*A. niger* var.*awamori* می‌باشد در حالی که الگوهای ZP_{25} , ZP_{24} , ZP_{23} , ZP_{22} , ZP_9, ZP_{12}, ZP_{18} , ZP_{20}و ZP_{26} مربوط به *A. niger* var.*niger* است و الگوهای ZP_{11}, ZP_{10} و ZP_{16} بین دو واریته مذکور مشترک است (شکل ۱، ۲ و۳).

بحث

بررسیهای ریخت شناسی انجام شده در این مطالعه نشان داد که گونه‌های موجود در یک بخش (section) تشابه زیادی از لحاظ صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی دارند. بطور مثال در بخش niger (بخش آسپرژیلوسهای سیاه) گونه *A. niger* دارای دو واریته *niger* و *awamori* است که این دو واریته از لحاظ تمامی صفات ماکروسکوپی کاملاً مشابهند و تمامی صفات میکروسکوپی آنها بجز تزئینات سطح کنیدیهای بالغ با هم همپوشانی شدید دارد(٤)، در این بخش گونه‌های آسپرژیلوس سیاه دیگری مانند *A. carbonarius, A. foetidus*، نیز وجود دارند که تفاوت اندکی از لحاظ ریخت‌شناسی بین آنها وجود دارد و تنها از روی یک یا دو صفت میکروسکوپی قابل تمایز هستند(۱۳). در بخش فلاووس علاوه بر گونه *A. flavus* گونه‌های بسیار نزدیک به آن مثل *A. tamarii, A. soja , A. parasiticus* وجود دارند که تشابه آنها به *A. flavus* بحدی است که Kurtzman و همکاران(١٤) پیشنهاد کردند که گونه‌های مذکور زیر گونه یا واریته‌هایی برای *A. flavus* در نظر گرفته شوند، اما مطالعات تکمیلی آنها براساس DNA قارچهای مذکور نشان داده است که هر کدام از این قارچها گونه‌ای مجزا از *A. flavus* هستند(١٤)، بنابراین ترتیب دیگری نیز در بخشهای دیگر از زیر جنسهای مختلف *Aspergillus* مشاهده می‌شود. وجود مسائل ذکر شده، مطالعات ریخت‌شناسی محض را با مشکلاتی مواجه می‌کند. با اینکه مطالعات مولکولی زیادی روی گونه‌های این جنس صورت گرفته، بویژه روی گونه‌هایی که از لحاظ اقتصادی و صنعتی یا بیماریزایی انسانی اهمیت بیشتری داشته‌اند، اما این مطالعات سمت و سوی تاکسونومیکی کمتری داشته و بیشتر به مسائل فیزیولوژی و یا مولکولی یک یا چند گونه محدود مربوط می‌شود(٦،١١،١٢،١٨،٢٠) دراین تحقیق سعی شد علاوه بر مطالعه صفات ریخت‌شناسی و شناسایی معمول تاکسونومیکی دوگونه *Aspergillus* بدست آمده از میزبانهای مختلف، یک روش ساده و سریع بیوشیمیایی نیز بکار گرفته شود تا علاوه بر مشخص نمودن تفاوتهای بین گونه‌ای، تنوع درون گونه‌ای را نیز به نمایش بگذارد. در ۷۰ جدایه خالص شده از دوگونه *Aspergillus* بدست آمده در این تحقیق تمامی نمونه‌ها توانایی ترشح آنزیمهای پکتیناز را داشتند.

براساس نظر Al-Musalam (٤) گونه *A. niger* دارای دو واریته *awameri* و *niger* می‌باشد، این دو گونه براساس صفات ماکروسکوپی کاملاً مشابه هستند و صفات میکروسکوپی آنها نیز در همه بجز وضعیت سطح کنیدیهای بالغ همپوشانی و تشابه بسیار زیادی دارد. بررسی الگوهای زایموگرمی این دو واریته در طی این مطالعه نشانگر وجود دو باند پکتین استراز با فاصله‌ای ثابت از یکدیگر در تمامی نمونه‌ها بود. احتمالاً توالی ژنی مسئول تولید این آنزیم به شدت حفاظت شده است. در *A. niger* براساس الگوهای بدست آمده به جز سه مورد ($ZP_{14}, ZP_{15}, ZP_{20}$) که بین هر دو واریته مشترک بود، واریته *niger* با دارا بودن ۹ الگو، تنوع بیشتری را نسبت به واریته *awamori* با ٦ الگو نشان می‌دهد. همچنین توانایی تولید آنزیم پلی‌گالاکتوروناز نمونه‌های واریته *niger* بیشتر از نمونه‌های واریته *awamori* بود. قابل ذکر است که در هیچیک از جدایه های بررسی شده واریته *awamori* دیده نشد که دارای باند پلی گالاکتوروناز زیر پکتین استراز باشد. تنوع الگوهای ترشح ایزوزیمهای پکتیناز در گونه *A. niger* بیشتر از دیگر گونه‌های مطالعه

Archive of SID

www.SID.ir

شده در این تحقیق است. در بررسی میزبانهایی که *A. niger* از آن جدا شده است، تعداد میزبانهایی که بافتهای پکتینی دارند بیشتر از بقیه گونه‌ها به چشم می‌خورد(گیاهان بیمار، گیاهان خشک و دارویی، خشکبار)، بنابراین این احتمال وجود دارد که گونه *A. niger* از لحاظ ترشح ایزوزیمهای پکتیناز و استفاده از بافتهای گیاهی از موفق‌ترین گونه‌های آسپرژیلوس باشد کما اینکه بسیاری از گزارشات و مقالات حاکی از این مطلب است(۳ و۲۵) بعلاوه اکثر مطالعات پکتینازی مربوط *Aspergillus* روی گونه *A. niger* صورت گرفته است(۵،۱۲،۱۷).

بر اساس این مطالعه، *A. flavus* از لحاظ تنوع گروههای زایموگرمی بعد از *A. niger* قرار می‌گیرد، این گونه از لحاظ همگنی و ثبات الگوهای زایموگرمی برخلاف گونه نایجر ناهماهنگی و عدم ثبات بسیار زیادی از خود نشان می‌دهد. به این نحو که در این گونه تنها الگوهای زایموگرم حاوی پلی گالاکتوروناز دیده می‌شود نه الگوهای حاوی پکتین استراز، همچنین دو الگوی ZP_7 و ZP_8 مشاهده شدند، زیرا دارای هر دو آنزیم (پلی گالاکتوروناز و پکتین استراز) هستند.

Lager و همکاران(۱۵) طی مطالعاتی که روی چند گونه از *Aspergillus* انجام دادند بیان نمودند که در بین گونه‌های مورد بررسی، *A. flavus* میزبان اختصاصی برای خود ندارد، شاید ناهمگنی شدید مشاهده شده در نمونه‌های این گونه براساس روش پکتیک زایموگرام و تولید ایزوزیمهای پکتینازی بواسطه همین عدم اختصاصی بودن گونه نامبرده برای میزبانهای خاص است(۱۵).

Surve-Lyer و همکاران (۲۲)، بیان می‌کنند تعیین گونه‌های قارچی عموماً براساس اختلافهای ریخت‌شناسی انجام می‌شود، اما گونه‌ها و جمعیتها ممکن است از نظر ریخت‌شناسی غیر قابل تشخیص باشند ولی از لحاظ ژنتیکی از هم متمایز شوند(۲۲). روشهای بیوشیمیایی و ژنتیکی مثل آنالیز ایزوزیمها می‌تواند در تعیین تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای قارچها بکار گرفته شود، همچنین از این روشها می‌توان در تعیین میزان تنوع جمعیتهای مختلف قارچی جدا شده از میزبانهای گوناگون استفاده نمود(۱). تحقیقات مشابهی در باره *Fusarium* توسط Szeczi (۲۳) و درباره *Sclerotinia* توسط Cruickshank (۸) صورت گرفته است که در این تحقیقات هم به تشابه الگوهای مربوط به یک گونه و هم بوجود تنوع درون گونه‌ای اشاره شده است. وجود الگوهای زایموگرمی مشخص برای هر گونه نشان دهنده آن است که پکتیک زایموگرم می‌تواند روش سریعی برای شناسایی گونه‌های قارچ *Aspergillus* به حساب آید (وجود یک زوج باند پکتین استراز در گونه *niger*) در این روش تعداد زیادی جدایه همزمان آماده شده و الگوی الکتروفورزی آنها به‌دست می‌آید. از آنجا که میزان همپوشانی الگوهای زایموگرمی برای گونه‌های مورد بررسی بسیار کم بوده و براحتی قابل تشخیص می‌باشند می‌توان با تعیین نوع الگو و با توجه به خصوصیات ماکروسکوپی قارچ، گونه قارچ مورد بررسی را مشخص کرد.

Cruickshank and Pitt (۹) این نتایج را برای برخی گونه های *Penicillium* بدست آوردند، آنها جدا کردن گونه‌های *Penicillium* را با روش ریخت‌شناسی، مشخصات رشد و یا توسط متابولیتهای ثانویه را کار مشکلی می‌دانند، بهمین دلیل زایموگرم را وسیله‌ای با ارزش برای حل این مشکل دانسته‌اند(۹). MacNish و همکاران (۱٦) نیز این روش را برای تشخیص کشتهای *Rhizoctonia* مناسب می‌دانند. برای دقیق تر شدن نتایج تجزیه و تحلیل الگوهای زایموگرمی بویژه در مورد تنوع درون گونه‌ای باید از تکنیکهای دیگری نظیر PCR و RFLP نیز بهره برد. همچنین پیشنهاد می‌شود این روش برای گونه‌های دیگر *Aspergillus* نیز مورد استفاده قرار گیرد تا اطلاعات جامع‌تری در خصوص تنوع بین و درون گونه ای بدست آید

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

۱. ایران‌پور، مهناز. ۱۳۷۹. شناسایی و طبقه‌بندی جنس فوزاریوم با استفاده از نشانگر پکتیک زایموگرم. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی. دانشگاه اصفهان. ۹۷.

۲. کسلخه، ارازمحمد. ۱۳۷۸. بررسی پراکنش و رابطه تنوع آنزیمی با بیماریزایی پاتوارهای قارچ *Rhizoctonia solani* AG3 با استفاده از مارکر پکتیک زایموگرام. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم گیاهی. دانشگاه اصفهان. ۱۰۲.

۳. مرادی، محمد. ارشاد، ج.، علایی، ح.، امینایی، م. و معصومی، ح. ۱۳۷۹. تعیین تراکم گونه های *Aspergillus* در ماههای مختلف سال در شرایط باغهای پسته استان کرمان. چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، ۱۲۸.

4. Al-Musalam, A. 1980. Revision of the black *Aspergillus* species. Ph.D Thesis. Utrecht, Netherlands : University of Utrecht (Eds. Klich and Pitt 1988). July, N.S.W., 115.

5. Angelova, M. Sheremetska, P. and Lekov, M. 1998. Enhaced polymethylgalacturonase production from *Aspergillus niger* by calcium alginate immobilization. Process Biochemistry 33: 299-305.

6. Anthony, T., Chandra Raj, K., Rajendran, A. and Gunasekaran, P. 2003. High molecular weight cellulase-free xylanase from alkali-tolerant *Aspergillus fumigatus*. Enzyme and Microbial Technology 32: 647-654.

7. Balali, R. and Iranpour, M. 2006. Application of pectic zymogram in the identification of *Fusarium* genetic variation. The 7th International Mycological Congress, Oslo, Norway, 190.

8. Cruickshank, R. H. 1983. Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. Transactions of the British Mycological Society 80: 117-119.

9. Cruickshank, R. H. and Pitt, J. I. 1987. Identification of species in *Penicillium* subgenus Penicillium by enzyme electrophoresis. Mycologia 79: 614-620.

10. Cruickshank, R. H. and Wade, G. C. 1980. Detection of pectic Enzymes in pectin-acrylamid gels. Analytical Biochemistry, 107: 177-181.

11. Hong, S., Horiuchi, H. and Akinori,O. 2003. Molecular coloning of a phospholipase D gene from *Aspergillus nidulans* and characterization of its deletion mutants. Microbiology Letters 224: 231-237.

12. Kittur, F. S., Vishu Kumar, A. B. and Gowda, R. L. 2003. Chitosanolysis by a pectinase isozyme of *Aspergillus niger*. Carbohydrate Polymers 53: 191-196.

13. Klich, M. A. and Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs, N.S.W., 115.

14. Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnett, C. J. and Wicklow, D. T. 1986. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. Mycologia 78: 955-959.

15. Lager, J. S., Screen, E. S. and Pirzadeh, B. 2000. Lack of host specialization in *Aspergillus flavus*. Applied and Environmental Microbiology 66: 320-324.

16. MacNish, G. C., Carling, D. E., Sweetingham. M. W. and Brainard, K. A. 1994. Anastomosis group (AG) affinity of pectic isozyme (Zymogram) groups (ZG) *Rhizoctonia solani* from the western Australia cereal-belt. Mycological Research 98: 1386-1375.

17. Pashova, S., Slokoska, L., Krumova, E. and Angelova, M. 1999. Induction of polymethylgalacturonase biosynthesis by immobilized cells of *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology 24: 535-540.

18. Perez, P., Martinez, O., Romero, B., Laborda. F. and Olivase, I. 2003. Functional analysis of mutations in the human carnitine/acylcarnitine translocase in *Aspergillus nidulans*. Fungal Genetics and Biology 39: 211-220.

19. Rapper, K. B. and Fennell, D. I. 1973. The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger, Huntington, New York, 686.

20. Romero, B., Turner, G., Olivas, I. and Laborada, F. 2003. The *Aspergillus nidulans* alcA promoter drives tightly regulated conditional gene expression in *Aspergillus fumigatus* permitting validation of essential genes in this human pathogen. Fungal genetics and Biology 40: 110-121.

21. Sakai, T. A., Sakamoto, T., Hallaert, J. and Vondamme, E. J. 1993. Pectin, Pectinase and protopectinase. Production, properties, and applications. Academic Press, New York, 213-294.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Surve-lyer, P. S., Adams, G. C., Lezzoni, A. F. and Jones, A. L. 1995. Isozyme detection and variation in leucostoma species from *Prunus* and *Malus*. Mycologia 87: 471-482

23. Szeczi, A. 1990. Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* species. Comparison of polygalacturonase zymograms of *Fusarium culmorum* and *fusarium graminearum*. Journal of Phytopathology 130: 188-196.

24. Teixeira, M. F., Filho, J. L. and Duran, N. 2000. Carbon sources effect on pectinase production from *Aspergillus japanicus*. Brazilian Journal of Microbiology 31: 286-290.

25. Vries, R. P. and Visser,J. 2001. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccarides. Microbiology and Molecular Biology reviews 65: 497-522.

26. Zhi-Gang, W., Su-Yun, Ch. and Li-Ming, C. 1993. Study on pectinase and sclreotium producing abilities of two kinds of *Aspergillus flavus* isolates from Zhejiang. Mycopathologia 121: 163-168.

Archive of SID

Zymography variation of pectinase in *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*

Balali G.R.[1], Minaefar A.[1], and Sharifnabi B.[2]

[1] **Biology Dept., Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran**

[2] **Agriculture College, Isfahan University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran**

Abstract

The genus *Aspergillus* (Anamorph) belong to Deutromycets and have several species. Some of the species infecte human, animal, plants and nuts. Most of these species have ability to degrade plant components by production of pectinase enzyme. The species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* are the most popular species of this genus. Although these species could be identified using morphological characters, the interspecific and intraspecific variation could not be evaluated. Regarding pectic enzyme serection by the species, pectic zymogram technique was used as a simple and usefull method to identify the species and to detect inter and intraspecific variation. Initially the collected samples were transferred to the laboratory and after preparation were transferred on the appropriate media. The pure cultures were obtained for the sample with *Aspergillus* characteristics. Then *Aspergillus* fungi were identified microscopically based on morphological characters. As a result, 40 isolates of *A. niger* and 30 isolates of *A. flavus* were recognized. Then pured sampeles were transferred to liquid media contaning citrus pectin as a sole carbon source to induce the secretion of extracellular pectinase enzymes. After incubation for an optimised period the secreted pectinase enzymes was extracted and concentrated by Cephadex G150 and then loaded on the polyacrilamide horizontal gel and electerophoresed. There were 18 zymogram patterns for *A. niger* and 8 for *A. flavus*. The results based on the comparison of the zymogram patterns showed that there is inter and intraspecific variation for studied *Aspergillus* species. It seems this technique could be used not only for the species identification, but also use to study of epidemiology of the fungs.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus falvus*, Pectic Zymogram.

www.SID.ir