The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering.72, Summer 2022, p. 139-152
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۲، پیاپی ۷۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۱۳۹-۱۵۲
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: : تاریخ پذیرش:
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
doi 10.22051/JAB.2021.34309.1398

کاربرد روش ISSR در شناسایی سیستماتیکی و تفکیک جمعیت های گونه *Aspergillus flavus*

امیرعباس مینایی فر*[۱]

چکیده

مقدمه: *روش‌های مرسوم شناسایی بر اساس صفات ریخت‌شناسی هرچند در شناسایی گونه‌های مختلف آسپرژیلوس کارایی قابل قبولی دارند اما در تشخیص نژادها و جمعیت‌های گونه‌های این جنس عموما ناکارآمد هستند. این موضوع در مورد شناسایی جمعیت‌های Aspergillus flavus که یکی از گونه‌های بسیار مهم این جنس در زمینه‌های اقتصادی، بهداشتی است نیز صدق می‌کند.*

مواد و روش: *در این تحقیق جمعیت‌های این گونه که از پنج محصول خشکباری کشور بدست آمده بودند بر اساس صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مورد شناسایی قرار گرفتند، علاوه بر این، از بیست پرایمر استاندارد شده بر اساس روش Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) برای بررسی جمعیت‌های این گونه استفاده شد.*

نتایج و بحث: *آنالیزهای چند متغیره بر اساس یافته‌های ISSR نشان می‌دهد با استفاده از این روش می‌توان جمعیت‌های مختلف Aspergillus flavus جدا شده از میزبان‌های مختلف و مناطق مختلف را از یکدیگر تشخیص داد.*

واژه های کلیدی: ***Aspergillus flavus، خشکبار، ISSR، ریخت‌شناسی***

۱ . دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران*نویسنده مسئول: aaminaeifar@pnu.ac.ir

مقدمه

آسپرژیلوس یکی از قارچ‌های ناقص است که اولین بار توسط میچلی در سال ۱۷۲۹ توصیف شده است (Alexopoulos *et al*., 1996). این قارچ با دارا بودن حدود ۱۵۰ گونه شناخته شده که برخی نیز دارای واریته می‌باشند از گسترش جهانی برخوردارند، گونه‌های مختلف آسپرژیلوس با داشتن میزبان‌های متعدد و متفاوت از بعضی جهات به عنوان قارچی مفید و از جهاتی دیگر به عنوان یک قارچ مضر شناخته می‌شود (Klich & pitt, 1988). اکثر گونه‌های این جنس کپک‌های ساپروفیتی هستند که توان استفاده از بقایای آلی و بازیافت نیتروژن و کربن را دارند که از این ویژگی بطور گسترده در صنایع غذایی تخمیری استفاده می‌شود. اما برخی از گونه‌های این جنس جزو قارچ‌های فرصت طلب بوده و می‌توانند باعث بروز بیماری‌های خطرناکی مانند آسپرژیلوزیس شوند. همچنین بعضی از گونه های *Aspergillus* قادر به تولید مایکوتوکسین‌های مسموم کننده و سرطان زا مانند آفلاتوکسین هستند که هر ساله خسارات فراوانی را به محصولات کشاورزی وارد نموده و برای سلامت انسان نیز خطرناک اند (Yu *et al*.2005؛ Shabab *et al*. 2011).

در بین گونه‌های متعدد آسپرژیلوس، *Aspergillus flavus*، یکی از مهمترین و تاثیر گذارترین گونه‌های این جنس است. این قارچ با قدرت تکثیر بالا و تعدد میزبان‌های مختلف و همچنین توان تولید سم آفلاتوکسین یکی از رایج ترین گونه‌های این جنس است (Balali *et al*., 2010). به دلیل اهمیت این قارچ در زندگی انسان چه از جنبه‌های مثبت و چه از جنبه‌های منفی آن، شناسایی گونه‌های مختلف این قارچ حائز اهمیت است. بطور معمول برای تشخیص گونه‌های آسپرژیلوس از مشخصات ظاهری از جمله صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ و میزان رشد کلنی و صفات میکروسکوپی مانند ریخت‌شناسی ظاهری و اندازه-گیری وزیکول، کونیدی، کونیدیوفور، فیالید(Phialide) و متولا (Metula) استفاده می‌شود (Rapper & Fennell, 1975). گونه‌های آسپرژیلوس دارای تغییر پذیری ظاهری وابسته به شرایط محیط رشد هستند به علاوه صفات ریخت‌شناسی معرفی شده برای گونه‌های مختلف از لحاظ اندازه و حالت همپوشانی و شباهت‌های بسیار زیادی بهم دارند(Kich & Pitt, 1988) . همچنین برای تمایز گونه‌های این قارچ نیاز به شرایط کنترل شده و محیط‌های کشت استاندارد مختلفی است که هزینه بر و وقت گیر است و در نهایت از دقت بالایی نیز برخوردار نیست خصوصا در تشخیص واریته های آسپرژیلوس. به همین دلیل از ابتدای شناسایی این قارچ کلیدهای شناسایی متعددی ارائه گردیده که هر یک دارای ابهاماتی است (Rapper & Fennell, 1975). نیاز به صرف وقت زیاد جهت تهیه محیط‌های کشت استاندارد برای داشتن کلیه ویژگی‌ها و کاهش تاثیر عوامل محیطی، ناپایداری برخی از صفات و همپوشانی بسیاری از ویژگی‌های بین گونه‌های مختلف این قارچ، همچنین عدم توانایی کافی روش‌های ریخت‌شناسی در تشخیص و تعیین واریته‌های آسپرژیلوس سبب شده است که کوشش‌هایی جهت شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌های این قارچ با کمک روش‌های مولکولی صورت گیرد، بطور مثال می‌توان به استفاده از تکنیک‌های RLFP (Zhu *et al*., 2011)، RAPID (Patricia *et al*., 2003)، SSR (Jia *et al*., 2011)، AFLP (Liu *et al*., 2010) و ISSR (Zhang *et al*., 2013) اشاره کرد. همانطور که گفته شد روش‌های شناسایی بر مبنای صفات ریخت‌شناسی است هرچند در برخی از موارد خصوصا در تشخیص بین گونه‌ای روش‌هایی به نسبت کارآمد، ارزان و قابل اتکا هستند اما در تشخیص تنوعات و اختلاف بین واریته‌های آسپرژیلوس عموما ناکارآمد بوده و صفات ریخت‌شناسی در این خصوص به عنوان صفات افتراقی مطلوب تلقی نمی‌شود. از اینرو استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت تشخیص یا تفکیک بین واریته‌ها مورد استقبال قرار گرفته است (Batista *et al*., 2008). هدف از این

تحقیق، تعیین تنوعات درون گونه‌ای این قارچ در ایران و همچنین سنجش و بررسی ارتباط تنوعات جمعیتی این گونه با شرایط اقلیمی در سطح کشور است.

مواد و روش

در این تحقیق برای شناسایی و بررسی تنوعات درون گونه ای بین جمعیت‌های *Aspergillus flavus* جدا شده از تعدادی از محصولات خشکباری پرمصرف داخل کشور شامل بادام‌زمینی، توت خشک، انجیرخشک، پسته و بادام است که از مراکز اصلی تولید آنها در مناطق زراعی شهرستان‌های آستانه اشرفیه، تفت، استهبان، رفسنجان و بوانات نمونه برداری شده است، علاوه بر روش ریخت‌شناسی بر اساس صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی معمول از روش مولکولی ISSR نیز استفاده شد. در ابتدا از مراکز اصلی و عمده تولید و عرضه هریک از محصولات خشکباری نمونه تهیه شد، سپس در آزمایشگاه نسبت به کشت اولیه و جدا سازی آسپرژیلوس‌های موجود در نمونه ها اقدام شد، پس از خالص‌سازی آسپرژیلوس‌ها، جهت شناسایی دقیقتر گونه‌ها، نمونه‌های خالص شده به محیط‌های کشت MEA, CYA و CY20S انتقال داده شده و پس از گذشت یک هفته اقدام به اندازه‌گیری و مطالعه ریخت‌شناسی و ثبت اطلاعات آنها براساس روش کلیچ و پیت مبادرت شد (Klich & pitt, 1988)، برای آنالیز نتایج حاصل از اندازه گیری‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی از نرم افزار SPSS Ver. 20 استفاده شد. در بخش مطالعه مولکولی این تحقیق برای استخراج DNA از روش ژانگ استفاده شد (Zhang *et al*., 2013)، پرایمرهای مناسب، شرایط و نسبت محتوای ترکیبات PCR برای انجام مطالعه ISSR بنابر مطالعات و تحقیقات پیشین (Zhang *et al*., 2013; Al-Wadai *et al*.,2013 ; Salim *et al*., 2019) با اندکی تغییر بهینه سازی شدند (جداول۱، ۲ و ۳). محصول حاصل از فرایند PCR با استفاده از جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه روی ژل آگارز ۱۵٪ (W/V) در محلول TAE بافر (X ۱) ران شد. برای مشخص شدن تصویر باندها بر اثر تابش UV در دستگاه ژل داک از اتیدیوم بروماید استفاده شد. همچنین برای تعیین شاخص Ladder 100 bp بکار گرفته شده است. برای غربالگری باندهای حاصله از ژل ها تصویر گرفته و حضور باند (۱) و نبود باند (۰) در نظر گرفته شد. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات بدست آمده و انجام آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) و تعین پارامترهای تنوع ژنتیکی از نرم افزار GenAlex 6.4 استفاده شد. برای انجام آنالیزهای خوشه بندی و تجزیه به مولفه‌های اصلی نتایج بدست آمده از غربالگری باندها و همچنین سنجش ارتباط عوامل اقلیمی و آنالیز CCA از نرم افزار PAST ver. 2.17 استفاده شد.

نتایج

بر اساس نتیجه حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه در نرم افزار SPSS اختلاف معنی‌داری بین صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی (جدول ۴) واریته‌های جدا شده از منابع مختلف مشاهده نشد ($P> 0.05$)، بنابراین از انجام آزمون‌های تعقیبی دانکن و یا توکی و همچنین آنالیزهای چند متغییره نیز صرف نظر شد. نتایج بدست آمده از مطالعه ISSR نشان می‌دهد که در غربالگری اولیه، در مجموع از بیست پرایمر انتخاب شده، ۱۵۳ باند با ۷۶ درصد پلی‌مورفی حاصل شد. پرایمر ۸۳۴ ، با تولید ۱۲ باند بیش از سایر پرایمرها باند ایجاد نموده است. پس از آن پرایمرهای ۸۰۹ و ۸۱۷ با ۱۰ باند و پرایمرهای ۸۰۸، ۸۹۵ و ۸۹۹ با ۹ باند قرار دارند. همچنین پرایمرهای ۸۱۷،۸۳۵،۸۸۵،۸۹۵ و ۹۰۰ بیشترین پلیمورفیسم و پرایمرهای ۸۰۷ و ۸۸۰ کمترین پلی‌مرفیسم را

نشان دادند (جدول ۵). آنالیز اطلاعات بدست آمده از روش ISSR در نرم افزار GenAlex نشان‌دهنده وجود تنوع درون جمعیتی برابر با ۳۱ درصد و تنوع بین جمعیتی برابر با ۶۹ درصد است. آنالیز خوشه بندی انجام شده بر اساس UPGMA در نرم افزار PAST نشان‌دهنده سه خوشه مجزاست. جمعیت *Aspergillus flavus* جدا شده از بادام‌زمینی آستانه اشرفیه در خوشه اول، جمعیت جدا شده از بادام بوانات در خوشه بعدی و خوشه سوم در برگیرنده سه زیر خوشه پسته رفسنجان، توت خشک تفت و انجیر خشک استهبان است (شکل ۱). در آنالیز PCoA بر اساس مولفه‌های اصلی نیز قرابت بیشتر جدایه‌های خالص شده از پسته، توت و انجیر نسبت به جدایه‌های خالص شده از بادام‌زمینی و بادام مشهود است (شکل ۲). در آنالیز CCA عوامل زیست محیطی مناطق زراعی که نمونه برداری از آنها انجام شده شامل میانگین دمای سالانه، میانگین بارندگی سالانه، ارتفاع و عرض جغرافیایی نیز علاوه بر نتایج حاصل از ISSR مورد سنجش قرار گرفته و در محاسبات لحاظ می شوند که بر این اساس نتیجه حاصل از CCA نیز در شکل شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این آنالیز هم موید جدایی جمعیت‌های خالص شده از پسته، توت خشک و انجیر از جمعیت بادام و بادام زمینی است.

جدول ۱، پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (طراحی شده توسط دانشگاه بریتیش کلمبیا)

کد پرایمر	توالی (۵' به ۳')
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UBC 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG
UBC 873	GAC AGA CAG ACA GAC A
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG
UBC 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG
UBC 895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC
UBC 899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC ACT TCC
UBC 900	CCA CAG GTT AAC ACA

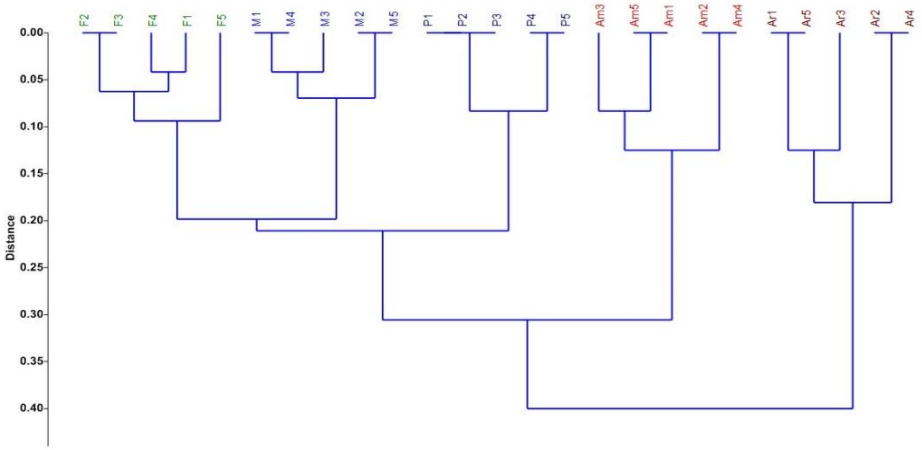
***: R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T), H= (A, C, T), V= (A, C, G)**

جدول ۲- مواد و حجم محلول ISSR-PCR مورد استفاده

ماده	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر استریل	۱۶/۳
بافر (۱۰ X)	۲
MgCl2	۱/۵
dNTP	۱
پرایمر	۱
Taq Polymerase	۰/۵

جدول ۳- برنامه دمایی ISSR-PCR مورد استفاده

مرحله PCR	شرایط تنظیم شده
واسرشت اولیه (First Denaturation)	۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
واسرشت (Denaturation)	۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد
اتصال (Annealing)	۴۵ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد
توسعه (Extension)	۱,۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد
توسعه نهایی (Final Extension)	۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد



شکل ۱- آنالیز خوشه بندی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس(*Aspergillus flavus*) بر اساس داده‌های ISSR

(Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک)

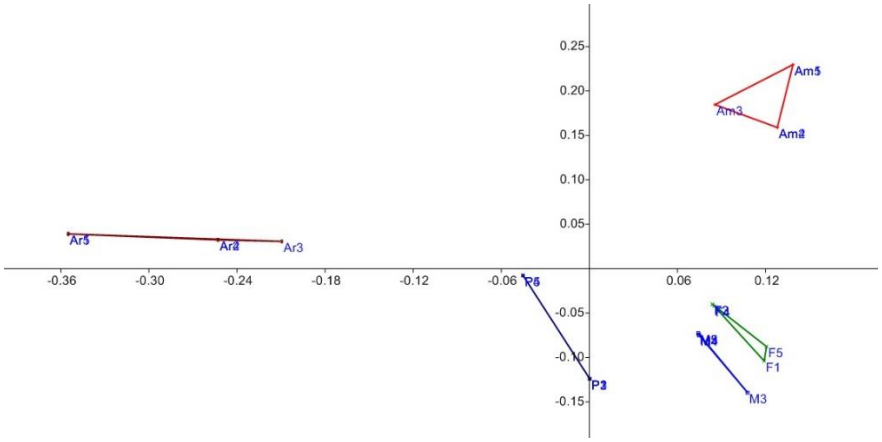
منبع جداسازی *A. flavus*	صفات ماکروسکپی									صفات میکروسکپی							
	محیط کشت CYA				محیط کشت CY۲۰S					محیط کشت MEA							کونیدی
	قطر کلنی (mm)	رنگ		قطر کلنی (mm)	رنگ		قطر کلنی (mm)	رنگ		قطر وزیکول (µm)	متوسط اندازه متولاها (µm)	متوسط اندازه فیالیدها (µm)	قطر (µm)	سطح			
		سطح زبرین	سطح زیرین		سطح زبرین	سطح زیرین		سطح زبرین	سطح زیرین								
بادام/بوانات	۲±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۲±۶۵	زیتونی	بی رنگ	۴±۶۰	زیتونی	قهوه ای	۹±۳۲	۵*۸	۴*۱۰	۱±۵		صاف		
بادام/بوانات	۳±۶۴	زیتونی- سبز	بی رنگ	۲±۶۵	زیتونی	قهوه ای	۱±۶۴	زیتونی	بی رنگ	۷±۳۴	۴*۹	۴*۱۰	۱±۵		صاف		
بادام/بوانات	۳±۶۷	زیتونی- سبز	بی رنگ	۲±۶۶	زیتونی- سبز	بی رنگ	۲±۶۵	زیتونی	بی رنگ	۵±۳۵	۶*۸	۳*۱۰	۱±۵		صاف		
بادام/بوانات	۳±۶۶	زیتونی	بی رنگ	۲±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۳±۶۴	زیتونی	بی رنگ	۶±۳۴	۵*۹	۳*۱۰	۱±۵		صاف		
بادام/بوانات	۲±۶۵	زیتونی- سبز	قهوه ای	۲±۶۵	زیتونی- سبز	قهوه ای	۱±۶۷	زیتونی	بی رنگ	۶±۳۷	۵*۸	۴*۱۰	۱±۵		صاف		
بادام زمینی/آستانه	۲±۶۸	زیتونی- سبز	بی رنگ	۳±۶۸	زیتونی	بی رنگ	۲±۶۵	زیتونی- زرد	قهوه ای	۴±۳۷	۵*۷	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
بادام زمینی/ آستانه	۳±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۳±۶۶	زیتونی	بی رنگ	۳±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۶±۳۴	۵*۸	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
بادام زمینی/ آستانه	۴±۶۴	زیتونی	قهوه ای	۴±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۵±۶۲	زیتونی	قهوه ای	۵±۳۵	۵*۸	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
بادام زمینی/ آستانه	۴±۶۵	زیتونی- سبز	قهوه ای	۵±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۵±۶۳	زیتونی	قهوه ای	۶±۳۶	۴*۹	۴*۱۱	۵±۱		صاف		
بادام زمینی/ آستانه	۴±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۴±۶۷	زیتونی- سبز	بی رنگ	۴±۶۳	زیتونی	بی رنگ	۵±۳۵	۵*۷	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
پسته/رفسنجان	۲±۶۴	زیتونی	بی رنگ	۳±۶۷	زیتونی	بی رنگ	۲±۶۶	زیتونی- زرد	قهوه ای	۴±۳۶	۵*۶	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
پسته/رفسنجان	۳±۶۵	زیتونی	بی رنگ	۳±۶۷	زیتونی	بی رنگ	۳±۶۵	زیتونی	بی رنگ	۵±۳۵	۵*۸	۴*۱۰	۵±۱		صاف		
پسته/رفسنجان	۴±۶۵	زیتونی	بی رنگ	۴±۶۵	زیتونی- سبز	بی رنگ	۳±۶۶	زیتونی	بی رنگ	۵±۳۵	۵*۸	۳*۹	۵±۱		صاف		

صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۶±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۵±۳	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۴	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۴	پسته/رفسنجان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۵±۳	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۴	بی رنگ	زیتونی	۶۵±۴	پسته/رفسنجان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۴±۵	قهوه ای	زیتونی	۶۳±۴	قهوه ای	زیتونی- سبز	۶۷±۵	قهوه ای	زیتونی	۶۸±۴	توت خشک/ تفت
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۴	قهوه ای	زیتونی	۶۷±۳	بی رنگ	زیتونی-سبز	۶۷±۳	قهوه ای	زیتونی- سبز	۶۵±۴	توت خشک/ تفت
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۶±۳	بی رنگ	زیتونی	۶۷±۲	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۴	توت خشک/ تفت
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۶±۶	قهوه ای	زیتونی	۶۶±۳	قهوه ای	زیتونی	۶۸±۳	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۴	توت خشک/ تفت
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۵	بی رنگ	زیتونی- زرد	۶۵±۴	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۵±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۷±۴	توت خشک/ تفت
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۶±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۴±۵	قهوه ای	زیتونی- سبز	۶۷±۵	قهوه ای	زیتونی- سبز	۶۸±۴	انجیرخشک/استهبان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۵	قهوه ای	زیتونی- زرد	۶۷±۴	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۷±۵	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۷±۴	انجیرخشک/استهبان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۵±۲	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۷±۴	بی رنگ	زیتونی- سبز	۶۶±۳	انجیرخشک/استهبان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۷*۵	۳۵±۶	قهوه ای	زیتونی	۶۶±۴	قهوه ای	زیتونی	۶۸±۴	قهوه ای	زیتونی- سبز	۶۵±۴	انجیرخشک/استهبان
صاف	۱±۵	۱۰*۴	۸*۵	۳۵±۶	بی رنگ	زیتونی- زرد	۶۵±۵	بی رنگ	زیتونی	۶۶±۵	قهوه ای	زیتونی	۶۷±۳	انجیرخشک/استهبان

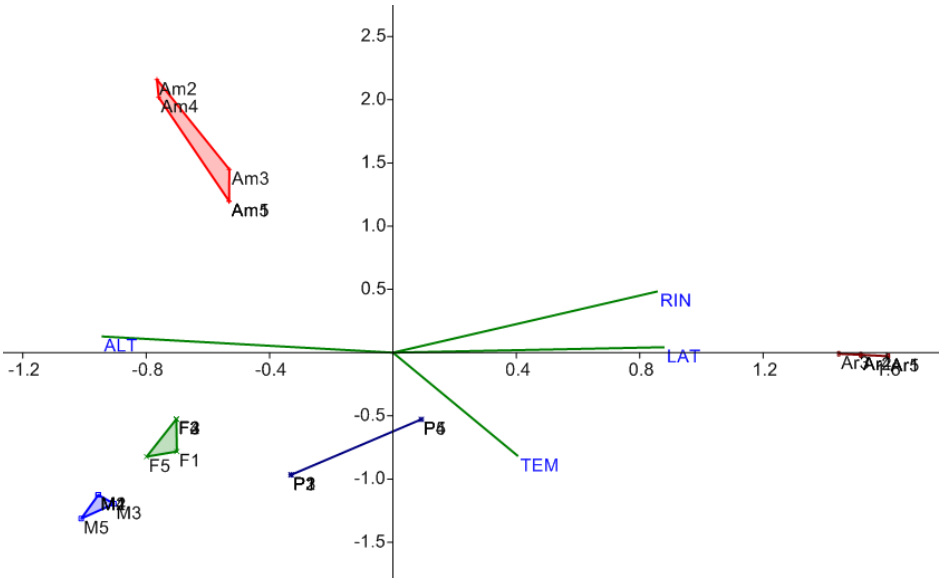
جدول ۴- صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطالعه شده

جدول ۵- تعداد باند و تعداد باندهای پلی مورف تشکیل شده توسط پرایمرهای مورد استفاده

کد پرایمر	تعداد باند	تعداد باند پلی مورف	در صد باند پلی مورف
UBC 807	۶	۳	٪۵۰
UBC 808	۹	۵	٪۵۵
UBC 809	۱۰	۶	٪۶۰
UBC 811	۸	۷	٪۸۷,۵
UBC 817	۱۰	۱۰	٪۱۰۰
UBC 825	۸	۷	٪۸۷,۵
UBC 826	۷	۶	٪۸۵,۷
UBC 834	۱۲	۱۰	٪۸۳,۳
UBC 835	۸	۸	٪۱۰۰
UBC 847	۶	۴	٪۶۶,۶
UBC 856	۷	۴	٪۵۷,۱
UBC 864	۷	۵	٪۷۱,۴
UBC 873	۶	۴	٪۶۶,۶
UBC 880	۸	۴	٪۵۰
UBC 881	۶	۴	٪۶۶,۶
UBC 885	۵	۵	٪۱۰۰
UBC 891	۸	۴	٪۸۷,۵
UBC 895	۹	۹	٪۱۰۰
UBC 899	۹	۸	٪۸۸,۸
UBC 900	۴	۴	٪۱۰۰



شکل ۲- آنالیز مولفه‌های اصلی جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس(*Aspergillus flavus*)بر اساس داده‌های ISSR
(Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک)



شکل ۳- آنالیز CCA جدایه‌های آسپرژیلوس فلاووس(*Aspergillus flavus*) بر اساس داده‌های ISSR و داده‌های محیطی
(Ar: بادام زمینی، Am: بادام، P: پسته، M: توت خشک، F: انجیر خشک، ALT: ارتفاع از سطح دریا، LAT: عرض جغرافیایی منطقه، RIN: متوسط بارندگی و TEM: متوسط دما)

بحث

استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی در شناسایی قارچ‌های ساپروفیت هرچند به دلیل سهولت نسبی مطالعه، تفکیک و شناسایی قابل قبول گونه‌ها و قیمت کمتر همچنان رایج و مورد استفاده هستند اما عموما توانایی تشخیص جمعیت‌های یک گونه را ندارند به‌نحوی که با استفاده از این روش‌ها امکان شناسایی و تفکیک افراد متعلق به یک گونه که از میزبان‌های مختلف جدا شده یا در شرایط اقلیمی متفاوتی رشد نموده‌اند وجود ندارد (Kumeda & Asao 1996)، نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپی و ماکروسکوپی صورت گرفته در این تحقیق نیز موید این مطلب است به نحوی که هرچند با استفاده از محیط‌های کشت تخصصی و استفاده از کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی امکان شناسایی و جداسازی گونه *A. flavus* از سایر گونه‌ها فراهم آمد، اما بدلیل تشابه زیاد صفات ریخت‌شناسی افراد این گونه و نبود تفاوت معنی‌دار بین آنها همانطور که در بخش نتایج اشاره شد امکان تفکیک جمعیت‌های این گونه با استفاده از این صفات میسر نشد ($P> 0.05$)، بنابراین هرچند از صفات ریخت‌شناسی در تفکیک بین گونه‌ها در جنس آسپژیلوس می‌توان استفاده نمود، اما این روش برای شناسایی و تفکیک جمعیت‌های گونه *A.flavus* کارآمد نیست. تاکنون تحقیقات نسبتا محدودی برای استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت شناسایی و تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌های *A. flavus* با استفاده از روش ISSR و سایر روش‌های مولکولی صورت گرفته است، به‌عنوان مثال Priyanka و همکاران با استفاده از روش ISSR برای شناسایی گونه‌های بخش *Flavi* از جنس آسپرژیلوس تلاش نموده‌اند (Priyanka *et al*., 2014) ، Al-Wadai و همکاران برای تشخیص بین نژادهای *A. flavus* مولد آفلاتوکسین آلوده کننده گندم از روش ISSR و RAPD استفاده کرده‌اند (Al-Wadai *et al*., 2013)، همچنین Salim و همکاران در مطالعه بین گونه‌ای آسپرژیلوس از روش ISSR استفاده نموده اند (Salim *et al*., 2019). در مطالعه حاضر نیز از روش ISSR برای تعیین اختلافات و تشابهات جدایه‌های بدست آمده از محصولات خشکباری از مناطق مختلف استفاده شد. بر اساس آنالیز خوشه بندی UPGMA و آنالیز مولفه‌های اصلی، جمعیت‌های جدایه‌های بدست آمده از مناطق مختلف در سه دسته کلی تقسیم بندی شدند. گروه اول جدایه‌های حاصل از بادام‌زمینی منطقه آستانه اشرفیه در استان گیلان، گروه دوم جدایه‌های خالص شده از بادام منطقه بوانات استان فارس و گروه سوم جدایه‌های خالص سازی شده از پسته منطقه رفسنجان، توت از منطقه تفت استان یزد و انجیر از منطقه استهبان استان فارس می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص توانایی روش ISSR در تفکیک جمعیت‌های *A. flavus* بدست آمده از مناطق مختلف و میزبان‌های مختلف را اثبات می‌کند. هرچند تاکنون مطالعات بسیار محدودی در خصوص استفاده از روش ISSR برای شناسایی جمعیت‌های آسپرژیلوس انجام گرفته اما نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعه Zhang و همکاران و همچنین مطالعه محمود و همکاران مطابقت دارد (Zhang *et al*., 2013; Mahmoud *et al*., 2016). اگرچه نتایج تحقیقات Al-Wadai و همکاران قویا نتایج این تحقیق را تایید نمی‌کند اما تاکید می‌نمایند که روش ISSR به نسبت روش RAPD از توانایی تفکیک بالاتری برای مطالعه بین جمعیت‌های *A. flavus* برخوردار است (Al-Wadai *et al*., 2013). بطور معمول در مطالعات مولکولی بین جمعیت گیاهان عالی جهت سنجش عوامل جغرافیایی مختلف موثر بر بروز اختلافات بین جمعیت‌ها از آنالیز CCA استفاده می‌شود (Minaeifar *et al*., 2015). اگرچه در مورد قارچ‌های ساپروفیت مانند گیاهان عالی عوامل اقلیمی ماکروکلیمایی به علت شرایط میکروکلیمایی تاثیر کمتری دارند (Minaeifar *et al*., 2016)، اما در این تحقیق با توجه به گستره

مناطق جغرافیایی و همچنین نمونه‌گیری مستقیم از محل‌های اصلی تولید محصولات خشکباری مورد مطالعه بلافاصله پس از برداشت و قبل از انبارشدن، آنالیز CCA بر اساس شرایط ماکروکلیمایی منطقی به نظر می رسید. از اینرو علاوه بر آنالیزهای معمول از این روش نیز در تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد. بر اساس نتیجه این آنالیز، موثرترین عوامل اقلیمی در جدا افتادگی جمعیت خالص شده از بادام بوانات نسبت به سایر جمعیت‌ها، متوسط دمای سالانه (۱۰ درجه، کمترین دما در بین مناطق مورد مطالعه) و ارتفاع از سطح دریا (۲۱۵۰ متر، مرتفع ترین منطقه در بین مناطق مورد مطالعه) بوده است، موثرترین عوامل جدایی جمعیت‌های خالص شده از بادام‌زمینی منطقه آستانه اشرفیه از جمعیت بادام بوانات درجه حرارت و از سه جمعیت دیگر میزان بارندگی است. منطقه آستانه اشرفیه در بین مناطق بررسی شده بیشترین میزان متوسط بارندگی (۱۵۰۰ میلیمتر) و رطوبت نسبی را داراست در حالی‌که سه منطقه تفت (۱۲۰ میلیمتر)، استهبان (۱۴۵ میلیمتر) و رفسنجان (۱۳۵ میلیمتر) کمترین میزان متوسط بارندگی را در بین مناطق مورد بررسی دارد. در خصوص گروه سوم شامل جمعیت‌های جدا شده از انجیر استهبان، پسته رفسنجان و توت تفت، علیرغم اینکه از لحاظ ماکروکلیماهایی مانند عرض جغرافیایی، ارتفاع منطقه از سطح دریا و میزان بارندگی بین منطقه رفسنجان از استان کرمان و منطقه استهبان از استان فارس قرابت بیشتری وجود دارد اما آنالیزهای PCOA و UPGMA بین جمعیت های جدا شده از انجیر استهبان و توت تفت تشابه بیشتری را نشان می‌دهد. بنظر می‌رسد در این خصوص تشابه ترکیبات و مواد مغذی میزبان (توت و انجیر هر دو از خانواده Moraceae هستند) موثرتر از تشابه ماکروکلیمای اقلیمی باشد ضمن اینکه بادام زمینی از خانواده Fabaceae و بادام از خانواده Rosaceae هستند که شاید یکی دیگر از دلایل جدایی بیشتر این دو از سایر جمعیت‌های مطالعه شده در این تحقیق نیز به علت تفاوت ترکیبات و مواد مغذی آنها باشد. پیشنهاد می‌شود تحقیقات دقیق تری دراین موضع صورت پذیرد چراکه در صورت وجود ارتباط معنی‌دار و قابل اثبات، می‌تواند افق جدیدی در شناسایی جمعیت‌های قارچی ایجاد نماید.

نتیجه گیری کلی:

از روش مولکولی ISSR می‌توان برای تعیین تنوعات درون گونه‌ای *Aspergillus flavus* استفاده کرد، با استفاده از این تکنیک می‌توان ضعف روش‌های معمول ریخت‌شناسی در تشخیص یا تفکیک جمعیت‌های این گونه را بر طرف نمود.

قدردانی:

از مراکز مختلف دانشگاه پیام نور که با در اختیار قرار دادن امکانات اسکان جهت نمونه‌برداری در فصول مناسب برداشت محصول در استان‌های گیلان، فارس، یزد و کرمان در انجام هرچه بهتر این تحقیق همراهی نموده‌اند قدردانی می‌گردد.

منابع

Alexopoulos, C. J., Mins, C. W. and Blackwell, A. (1996). Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York, 742.

Al-Wadai, A.S., Al-Othman, M.R., Mahmoud, M.A, Abd El-Aziz, A.R.M. (2013). Molecular characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of wheat grains from Saudi Arabia. Genetic and Molecular Research. 12(3): 335-352.

Balali, G.R., Minaeifar, A.A. and Sharifnabi, B. (2010). Pectic zymogram variation and morphological identification of *Aspergillus* species. Rostaniha 11(2): 163-174. 163-174.

Batista, P.P., Santos, J.F., Oliveira, N.T., Pires, A.P.D., Motta, C.M.S. and Lima, E.A., (2008). Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. Genetic and Molecular Research. 7(3): 706–717.

Jia, X.D., Wang, T., Zhai, M., Li, Y.R., Guo, Z.R., (2011). Genetic diversity and identification of Chinese-Grown Pecan using ISSR and SSR markers. Molecules 16, 10078–10092.

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

Kumeda, Y. and Asao, T. (1996). Single-strand conformation polymorphism analysis of PCR-amplified ribosomal DNA internal transcribed spacers to differentiate species of *Aspergillus* section *Flavi*. Applied and Environmental Microbiology. 62(8): 2947-2952.

Liu, W.D., Li, H.J., Bao, X.B., Gao, X.G., Li, Y.F., He, C.B., Liu, Z.J., (2010). Genetic differentiation between natural and Hatchery stocks of Japanese Scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) as revealed by AFLP analysis. International Journal of Molecular Sciences. 11(10): 3933–3941.

Mahmoud, M.A., EL-Samawaty, A.M.A.,Yassin, M.A. and AbdELAziz, A.R.M. (2016). Genetic diversity analysis of *Aspergillus flavus* isolates from plants and air by ISSR Markers. Genetic and Molecular Research. 15(2): 28-81.

Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, B., (2015). Genetic and morphological diversity in *Cousinia tabrisiana* (Asteraceae) populations. Biologia 70, 328-338.

Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, B., (2016). Biosystematic study in the genus *Cousinia* Cass. (Asteraceae), section *Cousinia* Biochemical Systematics and Ecology. Biochemical Systematics and Ecology 69. 252-260.

Patricia, R.D., Chirlei, G.B., Vanessa, K.C., Welington, L.A., Azevedo, J.L., (2003). RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mycological Research. 107(9): 1069–1074.

Priyanka, S.R., Uppalapati, S.R., Kingston, J.J., Murali, H.S. (2014). Development of ISSR-derived SCAR marker-targeted PCR for identification of *Aspergillus* section *Flavi* members. Letters in Applied Microbiology.58: 414-422.

Rapper, K. B. and Fennell, D. I. (1975). The genus *Aspergillus*. Robert E. Krieger, Huntington, New York, 686.

Salim R., Aly, S., Abo-Sereh, N. Hathout, A. and Sabry, B. (2019). Molecular Identification and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Differentiation of Toxigenic *Aspergillus* Strains. Jordan Journal of Biological Sciences. 12(5): 609 – 616.

Sahab, A.F., Aly, S.E., Nawar, L.S. and El-Faham, S.Y. (2011). Fungal occurrence in physic nut (Jatropha curcas) seeds during storage and possibility aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates. Journal of American Science.7(5): 11-516.

Yu, J., Cleveland, T.E., Nierman, W.C. and Bennett, J.W. (2005). *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. Revista Iberoamricana Micologia. 22:194-202.

Zhang, C., Xing, F., Selvaraj, J.N., and Yang, Q. (2013). The effectiveness of ISSR profiling for studying genetic diversity of *Aspergillus flavus* from peanut-cropped soils in China. Biochemical Systematics and Ecology. 50: 147-153.

Zhu, S., Bai, Y.J., Oya, M., Tanaka, K., Komatsu, K., Maruyama, T., Goda, Y., Kawasaki, T., Fujita, M. and Shibata, T. (2011). Genetic and chemical diversity of *Eleutherococcus senticosus* and molecular identification of Siberian ginseng by PCR-RFLP analysis based on chloroplast intron sequence. Food Chemistry.129:1844–1850

Application of ISSR method in systematic identification and segregation of populations of *Aspergillus flavus*

A.A. Minaeifar[1]*

Received: 19.06.2021
Accepted: 21.05.2022

Abstract*:*

Conventional morphological identification methods, although reasonably effective in identifying different species of *Aspergillus*, are generally ineffective in identifying the races and populations of *Aspergillus* species. It is also true about *Aspergillus flavus*, which is one of the most important *Aspergillus* species in Economic and health. In this study, in addition to morphological identification based on microscopic and macroscopic traits of *Aspergillus flavus* isolates from five dried fruit products, twenty standardized primers based on ISSR method were used to study the populations of this species. Statistical Multivariate analyzes based on ISSR findings show different populations from different sources and different locations of *Aspergillus flavus* can distinguished from each other by this method.

Key words: Aspergillus flavus, ISSR, Nuts, Morphology

---

1 Associate Professor, Department of Biology. Payame Noor University, Tehran, Iran *Corresponding author: aaminaeifar@pnu.ac.ir