DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

استفاده از روش ISSR در مطالعه سیستماتیکی و تعیین تنوعات جمعیت‌های گونه *Aspergillus niger*

امیرعباس مینایی فر*

ایران، تهران، دانشگاه پیام نور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

آسپرژیلوس نایجر یکی از رایجترین گونه‌های جنس آسپرژیلوس با پراکنشی وسیع در سطح جهان و گستره‌ای نامحدود از میزبان‌های متعدد است، با توجه به اهمیت این گونه در اقتصاد، سلامت و بهداشت شناسایی این گونه حایز اهمیت می باشد، هرچند روش‌های مرسوم ریخت‌شناسی در شناسایی بعضی گونه‌های آسپرژیلوس کارایی قابل قبولی دارند اما در تشخیص ورایته‌های گونه‌های این جنس عموماً ناکارآمد هستند، این موضوع در مورد شناسایی جمعیت‌های آسپرژیلوس نایجر نیز صدق می‌کند، در این تحقیق علاوه بر شناسایی ریختی بر اساس صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نمونه‌های آسپرژیلوس نایجر جدا شده از پنج محصول زراعی و استراتژیک کشور شامل گندم، جو، ذرت، سویا و کلزا، از بیست پرایمر استاندارد شده بر اساس روش ISSR برای بررسی جمعیت‌های این گونه نیز استفاده شد. نتایج آنالیزهای چند متغیره بر اساس یافته‌های ISSR نشان می‌دهد با استفاده از این روش می‌توان واریته‌های آسپرژیلوس نایجر جدا شده از میزبان‌های متفاوت و مناطق مختلف را از یکدیگر تشخیص داد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس نایجر، دانه‌های روغنی، غلات، ISSR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۳۵۸۴۷۱۹ ، پست الکترونیکی: aaminaeifar@pnu.ac.ir

مقدمه

جنس *Aspergillus* اولین‌بار توسط Micheli در سال ۱۷۲۹ معرفی شد(۴)، این جنس حدود ۱۵۰ گونه شناخته شده دارد که با احتساب واریته ها و بعضاً نظرات گوناگون در خصوص تجمیع یا تفریق برخی گونه‌ها، تعداد گونه‌های آن تا ۲۰۰ مورد نیز اعلام شده است، بعضی از گونه‌های *Aspergillus* به دلیل تغذیه از میزبان‌های متعدد، سرعت تکثیر و سازگاری بالا جهان گستر می‌باشند، گونه‌های مختلف این قارچ بدلیل برخورداری از آنزیم‌های مختلف از بعضی وجوه بعنوان قارچی مفید و از وجوه دیگر بعنوان یک قارچ مضر شناخته می‌شوند(۱۰).

اکثر گونه‌های این جنس کپک‌های ساپروفیتی هستند که توان استفاده از بقایای آلی و بازیافت نیتروژن و کربن را دارا می‌باشند که از این ویژگی بطور گسترده در صنایع غذایی تخمیری استفاده می شود، اما برخی از گونه‌های این جنس از گروه 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 سرطان‌زا مانند آفلاتوکسین می‌باشند که هر ساله خسارات فراوانی را به محصولات کشاورزی وارد نموده و برای سلامت انسان نیز خطرناک می باشند (۲۳). در بین گونه های متعدد آسپرژیلوس، *Aspergillus niger* van Tieghem ، یکی از مهمترین و تاثیرگذارترین گونه‌های این جنس است که با قدرت تکثیر بالا و دارا بودن میزبان‌های مختلف از

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

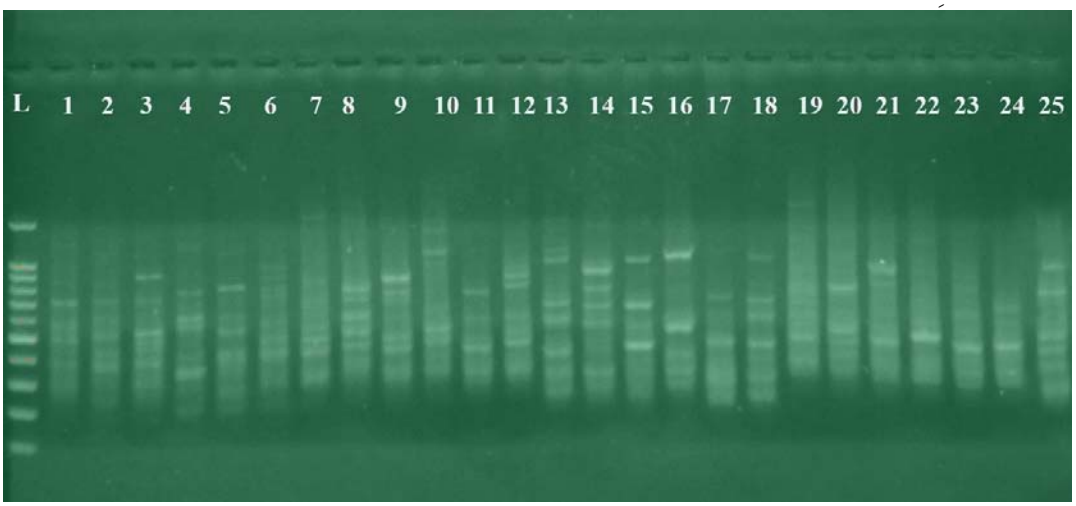
رایج‌ترین گونه‌های این جنس نیز می‌باشد (۶). آسپرژیلوس نایجر کاربردهای صنعتی متعددی در تولید اسیدهای آلی و آنزیم های صنعتی دارد (۱۴ و ۱۸). همچنین توانایی بالای این قارچ در آلوده سازی محصولات زراعی و ایجاد خطرات بهداشتی و تخریب محصولات (۱) باعث شده تا این گونه در زندگی انسان چه از جنبه‌های مثبت و چه از جنبه‌های منفی آن حائز اهمیت باشد. برای تشخیص گونه‌های *Aspergillus* بطور معمول از مشخصات ظاهری شامل صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ و میزان رشد کلنی و صفات میکروسکوپی مانند شکل و اندازه وزیکول، کونیدی، کونیدیوفور، فیالید و متولا استفاده می‌شود (۲۱). گونه‌های *Aspergillus* دارای تغییر پذیری ظاهری وابسته به شرایط محیط رشد هستند، بعلاوه صفات ریخت شناسی معرفی شده برای گونه‌های مختلف از لحاظ شکل ظاهری و ابعاد، شباهت‌های بسیار زیادی نیز به یکدیگر دارند (۱۰). همچنین برای تمایز برخی گونه‌های این قارچ نیاز به شرایط کنترل شده و محیط‌های کشت استاندارد مختلفی است که در بعضی موارد بسیار هزینه بر و وقت-گیر می‌باشد و در تشخیص واریته‌های *Aspergillus* نیز از دقت بالایی برخوردار نیست. به همین دلیل از ابتدای شناسایی این قارچ کلیدهای شناسایی متعددی ارائه گردیده که هر یک دارای ابهاماتی می‌باشند (۲۱). با توجه به نقاط ضعف ذکر شده در خصوص روش‌های ریخت شناسی، کوشش‌هایی جهت شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌های این قارچ با کمک روش‌های مولکولی مانند RLFP (۲۶)، RAPD (۱۹)، SSR (۹)، AFLP (۱۲) و ISSR (۲۴) انجام گرفته است، طی چندسال اخیر مطالعاتی مولکولی مختلفی روی گونه‌ها و واریته‌های آسپرژیلوس با استفاده از روش-های مولکولی با هدف تعیین ارتباطات درون و بین گونه‌ای این قارچ صورت گرفته است، همچنین علاوه بر تعیین روابط تکاملی، برخی از این مطالعات جهت تعیین واریته-های مولد مایکوتوکسین‌های مضر و سرطان‌زا بوده است (۷). 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 می‌باشد، تحقیقی که تاکنون در ایران انجام نگرفته است.

مواد و روشها

در این تحقیق بمنظور شناسایی و بررسی تنوعات درون گونه‌ای نمونه‌های *Aspergillus niger* از پنج محصول زراعی مهم و پرمصرف داخل کشور شامل جو، گندم، ذرت، کلزا و سویا و از قطب‌های اصلی تولید آن‌ها که بترتیب شامل شهرستان‌های قزوین، فسا، دزفول، مشهد و اردبیل می باشد، نمونه برداری شد، نمونه برداری بصورت تصادفی ساده و از پنج مزرعه در هر منطقه صورت گرفت. بمنظور سنجش ارتباط بین عوامل اقلیمی و یافته‌های مولکولی و برای کاهش اثر عوامل میکروکلیمایی ناشی از فرایندهای پس از برداشت و انبار داری، نمونه برداری‌ها بعد از برداشت و قبل از شروع فرایندهایی مانند خرمنکوبی، خشک کردن و انبار نمودن محصولات انجام گرفت، اطلاعات مزارع نمونه برداری شده شامل عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا با دستگاه جی پی اس مدل Garmin-etrex 10 ثبت شد، سایر اطلاعات لازم شامل متوسط بارندگی و متوسط دمای سالانه نیز با مراجعه به ایستگاه‌های هواشناسی هر شهرستان دریافت شد (جدول ۱). پس از جمع آوری نمونه‌ها و انتقال آنها به آزمایشگاه نسبت به کشت اولیه و جداسازی آسپرژیلوس‌های موجود در نمونه‌ها از سایر قارچ‌های همراه اقدام شد، پس از خالص سازی آسپرژیلوس‌ها، جهت شناسایی دقیقتر گونه-ها، نمونه‌های خالص شده به محیط‌های کشت افتراقی MEA, CYA و CY20S و شرایط استاندارد کشت داخل انکوباتور انتقال داده شد، پس از گذشت یک هفته از زمان کشت، نسبت به مطالعه و ثبت صفات ماکروسکوپی (۹ صفت اصلی متمایز کننده به ازای سه محیط کشت افتراقی مورد استفاده) و میکروسکوپی (۵ صفت اصلی متمایز کننده) و شناسایی نمونه‌ها بر اساس کلید استاندارد

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

شناسایی گونه‌های *Aspergillus* مبادرت شد(۱۰)، برای آنالیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی از نرم افزار SPSS Ver. 22 استفاده شد. در بخش مطالعه مولکولی این تحقیق برای استخراج DNA از روش ژانگ استفاده شد (۲۴). براساس پژوهش‌های قبلی (۵، ۲۲ و ۲۴)، تعداد بیست پرایمرهای مناسب انتخاب شد (جدول ۲)، همچنین شرایط و نسبت محتوای ترکیبات PCR برای انجام تحقیق حاضر به این شرح زیر بهینه سازی شد؛ برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرازی، ۰/۵ میکرولیتر DNA استخراج شده از هر نمونه به اضافه ۲ میکرولیتر بافر پی‌سی‌آر، ۱/۵ میکرولیترکلرید منیزیم،۱میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq polymeras و مابقی آب مقطر تا رسیدن به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه شد، برنامه دمایی نیز به این شرح تنظیم شد؛ ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۴۵ سیکلِ ۹۳ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه. محصول حاصل از فرایند PCR با استفاده از جریان برق ۱۱۰ ولت به مدت ۸۰ دقیقه روی ژل آگارز ۱/۵٪ (W/V) در محلول بافر TAE (۱ X) ران شد، بمنظور ظهور باندها از رنگ اتیدیوم بروماید و برای تعیین شاخص، از مارکر 100 bp استفاده شد. برای غربالگری باندهای حاصله، حضور و عدم حضور باندها بترتیب با کد ۱ و ۰ نمایش داده شد. بمنظور 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 انجام آنالیز CCA از نرم افزار PAST ver. 2.17 استفاده شد.



شکل۱- یک نمونه از تصویر ژل الکتروفورز حاصل از جمعیت‌های آسپرژیلوس نایجر با پرایمر UBC 834

جدول۱- داده‌های محیطی نقاط نمونه برداری

منطقه نمونه برداری	عرض جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا	میانگین دمای سالانه	میانگین بارندگی سالانه
اردبیل	"۵۵'۲۹۵۳۸	۱۳۰۳	۸/۵	۳۰۹
دزفول	"۲۱'۴۰۵۳۲	۱۴۵	۲۱	۳۱۱
فسا	"۳۷'۹۳۵۲۹	۱۳۲۱	۱۷/۵	۳۱۰
قزوین	"۰۶'۴۱۵۳۶	۱۲۸۷	۱۳	۳۰۱
مشهد	"۳۰'۲۶۵۳۶	۱۰۵۲	۱۵/۵	۲۴۲

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

نتایج

بر اساس نتیجه حاصل از آنالیز واریانس یکطرفه در نرم افزار SPSS اختلاف معنی‌داری بین صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی (جدول ۵) در واریته‌های جدا شده از منابع مختلف مشاهده نشد (P> 0.05)، بنابراین از انجام آزمون تعقیبی مانند دانکن و یا توکی و همچنین آنالیزهای چند متغییره بر اساس صفات ریخت شناسی صرفنظر شد. نتایج بدست آمده از مطالعه ISSR نشان می‌دهد که در غربالگری اولیه، در مجموع از بیست پرایمر انتخاب شده، پرایمر UBC 825، با تولید ۱۱ باند بیش از سایر پرایمرها باند ایجاد نموده است، پس از آن پرایمرهای UBC 809، UBC 834، UBC 899 وUBC 817 با تولید ۱۰ باند قرار دارند (جدول ۲). آنالیز اطلاعات بدست آمده از روش ISSR در نرم افزار GenAlex نشان‌دهنده وجود تنوع درون جمعیتی برابر با ۳۳ درصد و تنوع بین جمعیتی برابر با ۶۷ درصد است (جدول های ۳و ۴).

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (طراحی شده توسط دانشگاه بریتیش کلمبیا)

کد پرایمر	توالی (۵' به ۳')	محدوده اندازه باندها	T_m	تعداد باند	تعداد باند پلی مورف	درصد باند پلی مورف
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	۵۰۰-۱۰۰	۵۱	۵	۳	۶۰
UBC 808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	۱۳۰۰-۲۰۰	۵۳	۷	۵	۷۱/۴
UBC 809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	۱۰۰۰-۲۰۰	۵۲	۱۰	۶	۶۰
UBC 811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	۹۰۰-۲۰۰	۵۳	۷	۵	۷۱/۴
UBC 817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	۱۲۰۰-۲۰۰	۵۱	۱۰	۸	۸۰
UBC 825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	۱۲۰۰-۲۰۰	۵۲	۱۱	۸	۷۲/۷
UBC 826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	۹۰۰-۲۰۰	۵۲	۸	۵	۶۲/۵
UBC 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	۱۸۰۰-۱۰۰	۵۲	۱۰	۸	۸۰
UBC 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	۱۱۰۰-۱۰۰	۵۲	۷	۷	۱۰۰
UBC 847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	۷۵۰-۱۰۰	۵۱	۶	۶	۱۰۰
UBC 856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	۱۳۰۰-۲۰۰	۵۲	۸	۷	۸۷/۵
UBC 864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	۱۲۰۰-۲۰۰	۵۱	۸	۶	۷۵
UBC 873	GAC AGA CAG ACA GAC A	۱۸۰۰-۲۰۰	۵۲	۸	۵	۶۲/۵
UBC 880	GGA GAG GAG AGG AGA	۶۰۰-۲۰۰	۵۲	۹	۶	۶۶/۶
UBC 881	GGG TGG GGT GGG GTG	۷۵۰-۲۰۰	۵۳	۶	۶	۱۰۰
UBC 885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	۱۸۰۰-۲۰۰	۵۴	۸	۵	۶۲/۵
UBC 891	HVH TGT GTG TGT GTG TG	۹۰۰-۲۰۰	۵۴	۸	۴	۵۰
UBC 895	AGA GTT GGT AGC TCT TGA TC	۸۰۰-۲۰۰	۵۳	۸	۴	۵۰
UBC 899	CAT GGT GTT GGT CAT TGT TCC ACT TCC	۱۸۰۰-۱۰۰	۵۴	۱۰	۶	۶۰
UBC 900	CCA CAG GTT AAC ACA	۱۱۰۰-۱۰۰	۵۲	۶	۴	۶۶/۶

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

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

آنالیز خوشه‌بندی انجام شده بر اساس UPGMA در نرم افزار PAST نشان‌دهنده دو خوشه مجزاست، جمعیت آسپرژیلوس نایجر جداشده از کلزای مشهد بهمراه جمعیت جداشده از سویای اردبیل در یک خوشه و جمعیت‌های از گندم فسا، جوی قزوین و ذرت دزفول در خوشه‌ای دیگر قرار گرفته‌اند (شکل ۱). در آنالیز PCoA بر اساس مولفه-های اصلی قرابت جدایه‌های خالص شده از جوی قزوین، ذرت دزفول و گندم فسا از سایر جمعیت‌ها مشخص می‌شود، هرچند قرابت جدایه‌های گندم و ذرت با یکدیگر بیشتر است، در این آنالیز وضعیت دقیقتری از قرابت جدایه‌های حاصل از کلزا و سویا نیز مشخص می‌شود (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 (جدول ۱) نیز علاوه بر نتایج حاصل از ISSR مورد سنجش قرار گرفته و در محاسبات لحاظ می شوند که براین اساس نتیجه حاصل از CCA در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این آنالیز هم موید جدایی جمعیت‌های آسپرژیلوس نایجر خالص شده از غلات و دانه‌های روغنی است (شکل ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) جمعیت‌های آسپرژیلوس نایجر در نرم افزار GenAlex

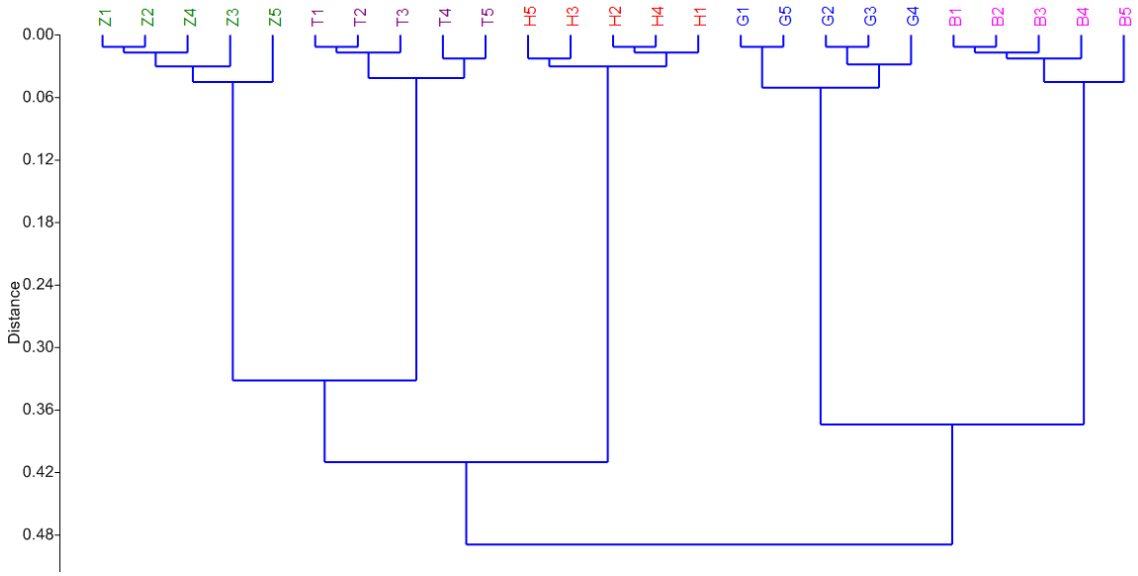
Source	df	SS	MS	Est.Var.	%	ΦPT
Among Pops	71	599.554	8.790	6.251	67%	67%
Within Pops	42	376.818	36.945	4.055	33%	
Total	112	976.372		10.306	100%	

df: degree of freedom; SS: sum of squared observations; MS: mean of squared observations; EV: estimated variance; ΦPT: proportion of the total genetic variance among individuals within an accession.

جدول ۴- ماتریس تشابه ژنتیکی (Nei) جمعیت‌های آسپژیلوس نایجر مطالعه شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

	P1	P2	P3	P4	P5
P1	1.000				
P2	0.683	1.000			
P3	0.914	0.614	1.000		
P4	0.632	0.778	0.609	1.000	
P5	0.819	0.601	0.807	0.741	1.000

P1= جمعیت فسا، P2= جمعیت مشهد، P3= جمعیت دزفول، P4= جمعیت اردبیل، P5= جمعیت قزوین



شکل۲- آنالیز خوشه‌بندی جدایه‌های آسپرژیلوس نایجر بر اساس داده‌های ^{ISSR} (B: کلزا، G: سویا، H: جو، T: گندم، Z: ذرت)

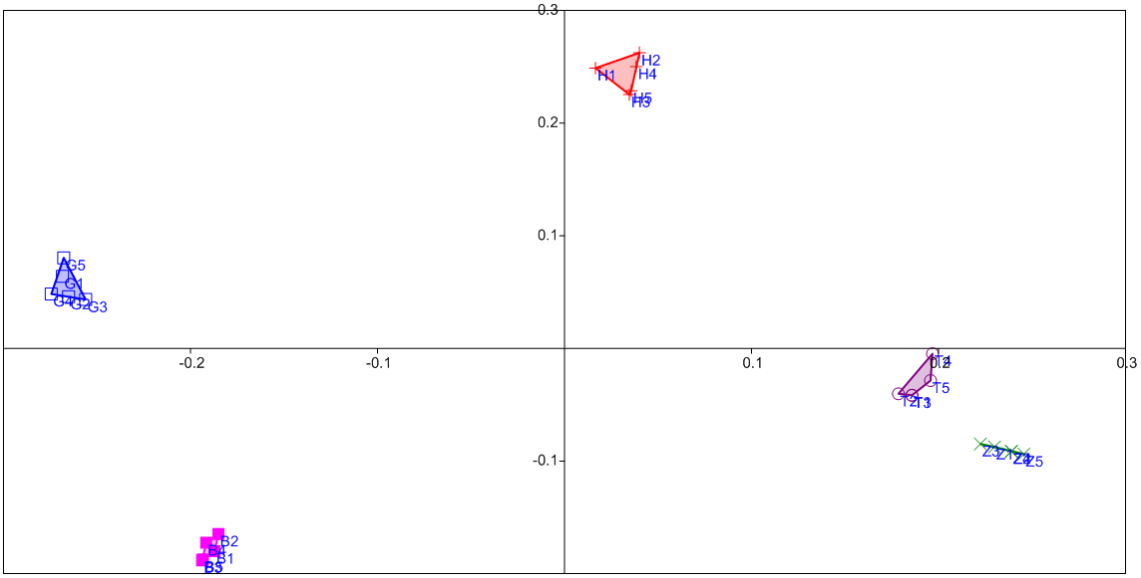
DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

جدول ۵- صفات میکروسکوپی و ماکروسکوپی مطالعه شده.

منبع جداسازی *A. niger*	صفات ماکروسکوپی									صفات میکروسکوپی			
	محیط کشت CYA			محیط کشت CY20S			محیط کشت MEA					کونیدی	
	رنگ		قطر کلنی (mm)	رنگ		قطر کلنی (mm)	رنگ		قطر وزیکول (µm)	متوسط اندازه متولاها (µm)	متوسط اندازه فیالیدها (µm)	قطر (µm)	سطح
	سطح زیرین	سطح زیرین		سطح زیرین	سطح زیرین		سطح زیرین	سطح زیرین					
جم- قزوین	سیاه	بی رنگ	۷۰±۲	سیاه	بی رنگ	۶۹±۲	سیاه	بی رنگ	۵۸±۴	۵۰±۱۴	۴۰±۱۰	۰.۵±۴	زیر
جم- قزوین	سیاه	زرد کمرنگ	۷۰±۱	سیاه	زرد	۶۲±۱	سیاه	بی رنگ	۶۱±۴	۵۰±۱۹	۴۰±۱۰	۰.۵±۴	زیر
جم- قزوین	سیاه	بی رنگ	۶۹±۳	سیاه	زرد	۶۴±۳	سیاه	بی رنگ	۶۵±۵	۶۰±۱۶	۳۰۹	۰.۵±۴	زیر
جم- قزوین	سیاه	زرد کمرنگ	۶۹±۲	سیاه	بی رنگ	۶۴±۲	سیاه	بی رنگ	۵۸±۵	۵۰±۱۶	۳۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
جم- قزوین	سیاه	بی رنگ	۷۰±۲	سیاه	زرد	۶۵±۲	سیاه	بی رنگ	۶۹±۶	۴۰±۱۲	۴۰۹	۰.۵±۴	زیر
ذرت - دزفول	سیاه	بی رنگ	۷۰±۱	سیاه	بی رنگ	۶۵±۳	سیاه	بی رنگ	۶۸±۵	۵۰±۱۸	۴۰۹	۰.۵±۴	زیر
ذرت - دزفول	سیاه	بی رنگ	۷۰±۲	سیاه	بی رنگ	۶۶±۳	سیاه	بی رنگ	۵۹±۴	۵۰±۱۸	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
ذرت - دزفول	سیاه	زرد کمرنگ	۷۰±۱	سیاه	بی رنگ	۶۲±۲	سیاه	بی رنگ	۵۱±۵	۴۰±۱۶	۳۰۹	۰.۵±۴	زیر
ذرت - دزفول	سیاه	زرد کمرنگ	۶۹±۳	سیاه	زرد	۶۴±۵	سیاه	بی رنگ	۶۴±۵	۴۰±۱۶	۳۰۸	۰.۵±۴	زیر
ذرت - دزفول	سیاه	بی رنگ	۶۸±۱	سیاه	بی رنگ	۶۳±۵	سیاه	بی رنگ	۶۵±۶	۶۰±۱۸	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
سویا - اردبیل	سیاه	بی رنگ	۷۰±۳	سیاه	زرد	۶۴±۳	سیاه	بی رنگ	۶۶±۴	۳۰±۱۶	۳۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
سویا - اردبیل	سیاه	بی رنگ	۶۹±۱	سیاه	بی رنگ	۶۴±۳	سیاه	بی رنگ	۵۵±۳	۵۰±۱۶	۴۰۱۱	۰.۵±۴	زیر
سویا - اردبیل	سیاه	زرد کمرنگ	۷۰±۲	سیاه	بی رنگ	۶۴±۲	سیاه	بی رنگ	۶۶±۵	۵۰±۱۸	۳۰۹	۰.۵±۴	زیر
سویا - اردبیل	سیاه	بی رنگ	۷۰±۲	سیاه	زرد	۶۳±۲	سیاه	بی رنگ	۵۵±۴	۶۰±۱۸	۴۰۱۱	۰.۵±۴	زیر
سویا - اردبیل	سیاه	بی رنگ	۷۰±۴	سیاه	بی رنگ	۶۳±۲	سیاه	بی رنگ	۵۲±۵	۴۰±۱۶	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
کلز- شهید	سیاه	بی رنگ	۶۹±۲	سیاه	زرد	۶۳±۳	سیاه	بی رنگ	۵۴±۳	۵۰±۱۹	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
کلز- شهید	سیاه	بی رنگ	۶۹±۳	سیاه	بی رنگ	۶۵±۳	سیاه	بی رنگ	۶۵±۴	۵۰±۱۸	۳۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
کلز- شهید	سیاه	زرد کمرنگ	۶۹±۲	سیاه	بی رنگ	۶۵±۳	سیاه	بی رنگ	۵۲±۵	۳۰±۱۴	۴۰۱۱	۰.۵±۴	زیر
کلز- شهید	سیاه	بی رنگ	۷۰±۱	سیاه	زرد	۶۴±۲	سیاه	بی رنگ	۶۹±۶	۴۰±۱۶	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
کلز- شهید	سیاه	زرد کمرنگ	۷۰±۲	سیاه	بی رنگ	۶۴±۲	سیاه	بی رنگ	۵۵±۴	۴۰±۱۸	۴۰۱۱	۰.۵±۴	زیر
گندم- فسا	سیاه	بی رنگ	۷۰±۱	سیاه	زرد	۶۴±۳	سیاه	بی رنگ	۶۷±۴	۴۰±۱۶	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
گندم- فسا	سیاه	بی رنگ	۶۹±۲	سیاه	بی رنگ	۶۵±۱	سیاه	بی رنگ	۶۸±۲	۵۰±۱۸	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
گندم- فسا	سیاه	زرد کمرنگ	۶۹±۲	سیاه	بی رنگ	۶۵±۲	سیاه	بی رنگ	۵۴±۲	۴۰±۱۶	۴۰۱۱	۰.۵±۴	زیر
گندم- فسا	سیاه	بی رنگ	۷۰±۱	سیاه	زرد	۶۴±۲	سیاه	بی رنگ	۵۳±۴	۵۰±۱۹	۴۰۱۰	۰.۵±۴	زیر
گندم- فسا	سیاه	بی رنگ	۷۰±۲	سیاه	زرد	۶۴±۵	سیاه	بی رنگ	۵۲±۳	۵۰±۱۸	۳۰۹	۰.۵±۴	زیر

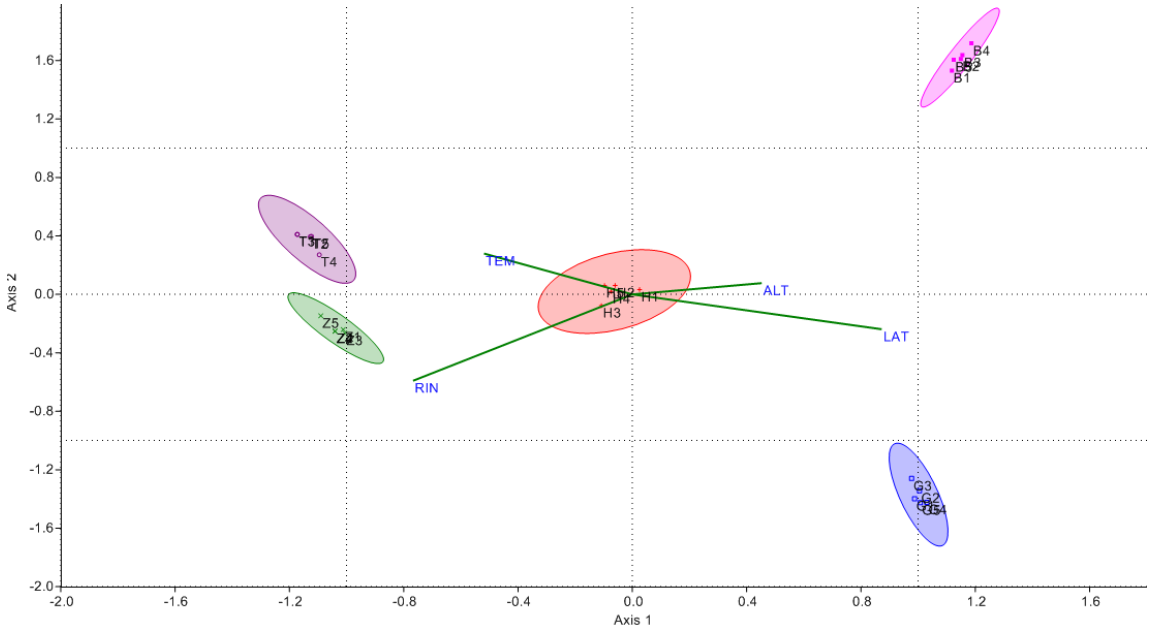
(P> 0.05)

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵



شکل ۳- آنالیز مولفه‌های اصلی (PCoA) جدایه‌های آسپرژیلوس نایجر بر اساس داده‌های ISSR

(B: کلزا، G: سویا، H: جو، T: گندم، Z: ذرت)



شکل ۴- آنالیز CCA جدایه‌های آسپرژیلوس نایجر بر اساس داده‌های ISSR و داده های محیطی(ارایه شده در جدول ۲)

(B: کلزا، G: سویا، H: جو، T: گندم، Z: ذرت، ALT: ارتفاع ازسطح دریا، LAT: عرض جغرافیایی منطقه، RIN: متوسط بارش و TEM: متوسط دما)

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

بحث و نتیجه گیری

روش‌های ریخت‌شناسی در شناسایی قارچ‌های ساپروفیت هرچند بدلیل سهولت نسبی، شناسایی قابل قبول گونه‌ها و هزینه کمتر همچنان رایج و مورد استفاده هستند اما عموماً توانایی تشخیص جمعیت‌های یک گونه را ندارند بنحوی که با استفاده از این روش‌ها امکان شناسایی و تفکیک افراد متعلق به یک گونه که از میزبان‌های مختلف جدا شده و یا در شرایط اقلیمی متفاوتی رشد نموده‌اند وجود ندارد (۱۱)، نتایج حاصل از مطالعه ریخت‌شناسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی صورت گرفته در این تحقیق نیز موید این مطلب است بنحوی که هرچند با استفاده از محیط‌های کشت تخصصی و کلیدهای شناسایی مرفولوژیک امکان شناسایی و جداسازی گونه *Aspergillus niger* از سایر گونه‌ها فراهم آمد، اما بدلیل تشابه زیاد صفات مرفولوژیکی افراد این گونه و نبود تفاوت معنی‌دار بین آنها همانطور که در بخش نتایج اشاره شد ($P> 0.05$)، امکان تفکیک جمعیت‌های این گونه با استفاده از این صفات میسر نشد. بنابراین، این روش برای شناسایی و تفکیک جمعیت‌های گونه *A.niger* کارآمد نیست. تاکنون تحقیقات محدودی برای استفاده از مارکرهای مولکولی جهت شناسایی و تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌های آسپرژیلوس خصوصاً *Aspergillus niger* با استفاده از روش ISSR صورت گرفته است، بعنوان نمونه Zhao و همکاران با استفاده روش‌های مولکولی ITS و ISSR به مطالعه جمعیت‌های این گونه پرداخته اند، بر اساس نتیجه این تحقیق با استفاده از روش‌های مولکولی ذکر شده امکان تشخیص جمعیت‌های گونه نایجر میسر شده است (۲۵)، Mazrou و همکاران نیز بمنظور شناسایی دقیقتر گونه‌های قارچی از جمله *A.niger* که در حل شدن فسفات اضافه شده به خاک‌های زراعی موثرند با استفاده از روش ISSR اقدام نموده‌اند (۱۵)، اما بیشتر مطالعات صورت گرفته با استفاده از تکنیک ISSR مربوط به گونه *A. flavus* می‌باشد، بعنوان مثال Priyanka و همکاران با استفاده از روش ISSR برای شناسایی گونه‌های سکشن Flavi از جنس آسپرژیلوس تلاش نموده اند، آنها بیان می‌کنند که این روش، روشی کارآمد و قابل اعتماد در شناسایی اعضای سکشن Flavi می‌باشد (۲۰)، الودایی و همکاران برای تشخیص بین نژادهای آسپرژیلوس فلاووس مولد آفلاتوکسین آلوده کننده گندم از روش ISSR و RAPD استفاده نموده اند، نتایج تحقیق آنها نشان داد روش ISSR نسبت به روش RAPD کارایی بهتری در تفکیک بین نژادهای مولد و غیر مولد آفلاتوکسین دارد (۵)، سلیم و همکاران در مطالعه بین گونه‌ای آسپرژیلوس از روش ISSR استفاده نموده اند، بر اساس نتیجه این تحقیق روش ISSR روشی مناسب برای تشخیص گونه-های آسپرژیلوس از یکدیگر است همچنین گزارش شده است که این روش در تفکیک واریته های مولد مایکوتوکسین نیز تا حدی موفق بوده است(۲۲). در مطالعه حاضر نیز از روش ISSR برای شناسایی جدایه های بدست آمده از محصولات زراعی از مناطق مختلف استفاده شد، بر اساس آنالیز خوشه‌بندی UPGMA و آنالیز مولفه‌های اصلی جمعیت‌های جدایه‌های بدست آمده از مناطق مختلف در دو دسته اصلی تقسیم‌بندی شد، گروه اول جدایه‌های حاصل از غلات گندم، جو و ذرت از فسا، قزوین و دزفول بود و گروه دوم جدایه‌های خالص شده از کلزا و سویا از مشهد و اردبیل می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص توانایی روش ISSR در تفکیک جمعیت های آسپرژیلوس نایجر بدست آمده از مناطق مختلف با نتایج حاصل از مطالعه Mazrou و همکاران و همچنین مطالعه هاشوش و همکاران در خصوص امکان تفکیک جمعیت‌های آسپرژیلوس نایجر با استفاده از روش‌های ISSR و RAPD مطابقت دارد (۸ و ۱۸)، نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از مطالعه ژانگ و همکاران و همچنین مطالعه محمود و همکاران در خصوص توانمندی روش ISSR در تشخیص جدایه‌های مختلف متعلق به یک

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

گونه آسپرژیلوس نیز مطابقت دارد (۱۳ و ۲۴). در مقایسه بین روش ISSR و RAPD نتایج تحقیقات الودایی و همکاران بیان می‌کنند که روش ISSR به نسبت روش RAPD توانایی تفکیک بیشتری در این خصوص نشان می‌دهد (۵).

از داده‌های ISSR و اطلاعات محیطی بطور معمول برای سنجش تنوع ژنتیکی و ارتباط آن با عوامل اقلیمی در جمعیت‌های وحشی و زراعی گیاهان گلدار استفاده می‌شود (۲و۳). همچنین در مطالعات مولکولی بین جمعیت گیاهان عالی جهت سنجش عوامل جغرافیایی مختلف موثر بر بروز اختلافات بین جمعیت‌ها، آنالیز CCA بکار گرفته می‌شود (۱۶)، هرچند در قارچ‌های ساپروفیت برخلاف گیاهان عالی، اثرگذاری عوامل اقلیمی ماکروکلیمایی بعلت حاکمیت شرایط میکروکلیمایی تاثیر کمتری دارند (۱۷)، اما در این تحقیق با توجه به گستره مناطق جغرافیایی و همچنین نمونه‌گیری مستقیم از محل اصلی تولید این محصولات بلافاصله پس از برداشت و قبل از انبارشدن، انجام آنالیز CCA بر اساس شرایط ماکروکلیمایی منطقی بنظر می‌رسید، از اینرو علاوه بر آنالیزهای معمول از این روش نیز در تجزیه و تحلیل نتایج استفاده شد، در این آنالیز فاکتورهای محیطی متوسط بارندگی و دمای سالانه (بازتابی رطوبت نسبی منطقه)، عرض جغرافیایی و ارتفاع از سطح دریا (بازتابی از میزان و شدت دریافت نور خورشید) بعنوان عوامل ماکروکلیمای موثر در نظر گرفته شده است (جدول ۱). ، بر اساس نتیجه این آنالیز (شکل ۴) موثرترین عوامل اقلیمی در جدا افتادگی جمعیت خالص شده از سویای اردبیل نسبت به سایر جمعیت‌ها، متوسط دمای سالانه (۸/۵ درجه سانتیگراد، کمترین دما در بین مناطق مورد مطالعه) و عرض جغرافیایی (بالاترین عرض جغرافیایی در بین مناطق مورد مطالعه و کمترین تابش آفتاب در سال) بوده است، موثرترین عوامل جدایی جمعیت‌های خالص شده از کلزای مشهد از سایر جمعیت‌ها متوسط بارندگی سالانه می‌باشد (کمترین میزان بارندگی متوسط در بین مناطق مورد مطالعه) و جدایی دو جمعیت از آسپرژیلوس‌های خالص شده از ذرت دزفول و گندم فسا بطور عمده تحت تاثیر میزان متوسط بارندگی سالیانه، متوسط دمای سالیانه و عرض جغرافیایی بوده است، منطقه قزوین بجز در عامل ارتفاع، از لحاظ عرض جغرافیایی، متوسط بارندگی و دما حالتی حدواسط داشته و این موضوع در خصوص موقعیت جمعیت‌های جوی جداشده از این محصول در نمودار آنالیز CCA نیز مشاهده می‌شود، بر اساس نتایج CCA و PCoA جمعیت جو قزوین به جمعیت‌های ذرت دزفول و گندم فسا نزدیکتر است تا جمعیت‌های کلزای مشهد و سویای اردبیل، بنظر می‌رسد تشابه ترکیبات و مواد مغذی گیاهان میزبان که همگی از خانواده Poaceae می باشند در این رخداد موثر باشد، در این خصوص بلالی و همکاران نیز در مطالعه صورت گرفته روی تنوعات درون گونه‌ای و بین گونه‌ای آسپرژیلوس با استفاده از روش زایموگرافی پکتیناز اشاراتی شده اما اثباتی در این مورد صورت نگرفته است (۶)، پیشنهاد می‌شود تحقیقات دقیقتری بر روی این موضوع صورت پذیرد چراکه در صورت اثبات وجود ارتباط معنی‌دار، می‌توان انتظار داشت افق جدیدی در شناسایی و ردیابی جمعیت‌های قارچ آسپرژیلوس گشوده شود.

بر اساس یافته های این تحقیق از روش مولکولی ISSR می‌توان جهت تعیین تنوعات درون گونه‌ای *A.niger* استفاده نمود و با استفاده از این تکنیک می‌توان ضعف روش‌های معمول ریخت‌شناسی در تشخیص یا تفکیک جمعیت‌های این گونه را بر طرف کرد.

سپاسگزاری

از مراکز مختلف دانشگاه پیام‌نور که با در اختیار قرار دادن امکانات اسکان جهت نمونه‌برداری در فصول مناسب همزمان با برداشت محصول در استان‌های خراسان

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9
مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

رضوی، فارس، خوزستان، قزوین و اردبیل در انجام هرچه بهتر این تحقیق همراهی نموده‌اند قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. بلالی، ر.، مینایی فر، ا. ع. و شریف نبی، ب. ۱۳۸۶. تنوع زایموگرافی پکتیناز در قارچ های *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger*. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۰، شماره ۱. صفحات ۵-۱۵.

۲. نوریان، ع. و شیروانی، ه. ۱۳۹۸. بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپهای پنیرک (*Malva neglecta*) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله پژوهشهای گیاهی. جلد ۳۲. شماره ۴.

۳. صالحیان، م.، درویش‌زاده، ر. و رضازادباری، م. ۱۴۰۰. ارزیابی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط برای صفات آگرومورفولوژیکی فلفل (*Capsicum* spp.) با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله پژوهشهای گیاهی. جلد ۳۴. شماره ۱.

4. Alexopoulos, C. J., Mins, C. W. and Blackwell, A. 1996. Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York, 742.
5. Al-Wadai, A.S., Al-Othman, M.R., Mahmoud, M.A., and AbdEl-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.
6. Balali, G.R., Minaeifar, A.A. and Sharifnabi, B. 2010. Pectic zymogram variation and morphological identification of *Aspergillus* species. Rostaniha 11(2): 163-174.
7. 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.
8. Hashoosh, Q. H., Al-Araji, A. M.Y. and Al-Assie, A. H. 2015. Genetic Diversity Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis for *Aspergillus niger* isolates. Iraqi Journal of Science; 56(4): 3376-3389.
9. Jia, X.D., Wang, T., Zhai, M., Li, Y.R. and Guo, Z.R., 2011. Genetic diversity and identification of Chinese-Grown Pecan using ISSR and SSR markers. Molecules 16. 10078 –10092.
10. Klich, M. A. and Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Published by commonwealth scientific and industrial Research. N.S.W. Australia. 515 p.
11. 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.
12. Liu, W.D., Li, H.J., Bao, X.B., Gao, X.G., Li, Y.F., He, C.B. and 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.
13. 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.
14. Majumder. L., Khalil, I., Munshi, M.K., Alam, K., RehanaBegum, H.O.R. and Alam, N. Citric acid production by *Aspergillus niger* using molasses and pumpkin as substrates. 2010. European Journal of Biological Sciences. 2(1): 1-8.
15. Mazrou, Y.S., Makhlouf, A.H., Elbealy, E.R., Salem, M.A., Farid, M.A., Awad, M.F., Hassan, M.M. and Ismail, M. 2020. Molecular characterization of phosphate solubilizing fungi *Aspergillus niger* and its correlation to sustainable agriculture. Journal of Environmental Biology. 41(3): 592-599.
16. Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, B. 2015. Genetic and morphological diversity in *Cousinia tabrisiana* (Asteraceae) populations. Biologia 7(3):328-338.
17. Minaeifar, A.A., Sheidai, M., Attar, F., Noormohammadi, Z., Ghasemzadeh-Baraki, S. 2016. Biosystematic study in the genus *Cousinia* Cass. (Asteraceae), section *Cousinia*. Biochemical Systematics and Ecology 69: 252-260.
18. Mrazek. H., Benada, O., Man, P., Vanek, O., Kren, V., Bezouska, K., Weignerova, L. 2012. Facile production of *Aspergillus niger* α-N-

DOR: 20.1001.1.23832592.1402.36.2.6.9 مقاله پژوهشی، صفحات: ۲۰۹-۱۹۵

acetylgalactosaminidase in yeast. Protein expression purification. 81(1): 106-114

19. Patricia, R.D., Chirlei, G.B., Vanessa, K.C., Welington, L.A. and Azevedo, J.L. 2003. RAPD analyses of recombination processes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Mycological Research. 107(9): 1069–1074.
20. Priyanka, S.R., Uppalapati, S.R., Kingston, J.J., Murali, H.S. 2013. Development of ISSR-derived SCAR marker-targeted PCR for identification of *Aspergillus* section *Flavi* members. Letters in Applied Microbiology.58: 414-422.
21. Rapper, K. B. and Fennell, D. I. 1973. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins publishing. New York. 686p.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Zhao, X., Song, G. Zhang, S. and Du, Ch. 2020. A Direct PCR on Conidiophore of *Aspergillus niger*. National Academy Science Letters.43(5): 435-437.
26. 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.

Morphological and genetic diversity of *Aspergillus niger* population, Using ISSR marker

Minaeifar A.A.

Dept. of Biology. Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Aspergillus niger is one of the most common species of the genus *Aspergillus* with a wide distribution and multiple hosts. Given the importance of this species in the economy, health and hygiene, the identification of this species is important, although morphological identification methods are suitable for detecting *Aspergillus* species, they are generally ineffective in identifying the races and populations of species of this genus. Therefore, some molecular techniques are using to dissolve this problem, in this study, isolated population of *Aspergillus niger* form five crops including: Wheat, Barley, Corn, Soybean and Rapeseed, identified by morphological methods. To determine of genetic diversity of that population, twenty standardized primers based on ISSR method used. SPSS, GeneAlex and PAST software use to statistical analysis, The results of statistical analysis based on ISSR findings showed, using this method, *Aspergillus niger* varieties isolated from different hosts and different regions can be distinguished from each other.

Key words: *Aspergillus niger*, Oilseeds, Cereals, ISSR