Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 2 (05-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Distribution and diversity of *Alt a1* gene in *Alternaria* species isolated from outdoor air of Tehran

Homa Afshar[1], Masoomeh Shams-Ghahfarokhi[1], Mehdi Razzaghi-Abyaneh[2]

1. Department of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Mycology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/10/19
Accepted: 2015/01/18
Available online:2015/06/10

Article Subject:
Medical Mycology

IJMM 1394; 9(2): 39-46

Corresponding author at:

Masoomeh Shams-Ghahfarokhi

Department of Mycology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email:
shamsm@modares.ac.ir

Abstract

Background and Aim: In the present study, distribution pattern and phylogeny of *Alternaria* species isolated from Tehran air was determine based on the homology of *Alt a1* gene.

Materials and Methods: A number of 48 *Alternaria* isolates belonging to *A. alternata* (33.4%), *A. solani* (23%), *A. tenuissima* (23%), *A. porri* (16.6%), and *A. brassicicola* (4%) obtained from Tehran air were cultured on Sabouraud dextrose agar. Genomic DNA was extracted from the isolates and amplified with forward and reverse specific primers of *Alt a1* gene. The resultant fragments of 500 to 600 bp of genomic DNA were sequenced and compared with genomic data of NCBI gene bank to evaluate phylogenetic relationship of *Alternaria* species.

Results: Based on the resulting dendrogram, isolates belonging to *A. alternata* and *A. solani* were distributed in 4 clusters and those of *A. brassicicola*, *A. porri*, and *A. tenuissima* each in 2 clusters. Approximately, 81% of *A. alternata* isolates, 73% of *A. solani* isolates, 45.5% of *A. tenuissima* isolates and 12.5% of *A. porri* isolates showed a similarity of 99% and resided in clusters I, II, IV and VII, respectively.

Conclusions: Our results indicated that *Alt a1* gene was present in all examined species and differences of sequence similarities of this gene shows the importance of species and strains of Alternaria in induction of allergenic reactions in suspected patients especially those with allergic asthma.

Key Words: *Alternaria* species, Allergen, Diversity, *Alt a1* gene, Tehran

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Afshar H, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Distribution and diversity of *Alt a1* gene in *Alternaria* species isolated from outdoor air of Tehran. Iran J Med Microbiol. 2015; 1394; 9(2): 39-46

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۲ – تابستان ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی حضور و تنوع ژن *Alt a1* در آلترناریاهای جداسازی شده از هوای تهران

هما افشار[۱]، معصومه شمس قهفرخی[۱]، دکتر مهدی رزاقی ابیانه[۲]

۱. گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. گروه قارچ شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت:۱۳۹۳/۰۷/۲۷
پذیرش:۱۳۹۳/۱۰/۲۸
انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۳/۲۰
موضوع:
قارچ شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(2): 39-46

نویسنده مسئول:

دکتر معصومه شمس قهفرخی
گروه قارچ شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۲۸۸۴۵۰۵

پست الکترونیک:
shamsm@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: در تحقیق حاضر، الگوی پراکندگی و فیلوژنی گونه های آلترناریای جدا شده از هوای تهران بر اساس حضور و تنوع ژن Alt a1 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: تعداد ٤٨ جدایه آلترناریا متعلق به گونه های *آلترناریا الترناتا* (٣٣/٤٪)، *آلترناریا سولانی* (٢٣٪)، *آلترناریا تنئوایسیما* (٢٣٪)، *آلترناریا پوری* (١٦/٦٪) و *آلترناریا براسیکولا* (٤٪) جداسازی شده از نمونه های هوای شهر تهران در پلیت های سابورو دکستروز آگار کشت و DNA آنها استخراج گردید. محصولات PCR از DNA ژنومی با استفاده از پرایمرهای مستقیم و معکوس ژن Alt a1 تکثیر شدند و قطعات ٥٠٠-٦٠٠ جفت بازی حاصل بمنظور بررسی ارتباط فیلوژنیک جدایه‌های آلترناریا تعیین توالی گردیدند.

یافته‌ها: دندروگرام حاصل نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه‌های *آلترناریا الترناتا* و *آلترناریا سولانی* در ٤ زیر شاخه و *آلترناریا براسیکولا*، *آلترناریا پوری* و *آلترناریا تنئویسما* هر یک در ٢ زیر شاخه ی مجزا طبقه بندی شدند. ٨١ درصد از جدایه های *آلترناریا الترناتا*، ٧٣ درصد از جدایه های *آلترناریا سولانی*، ٤٥/٥ درصد از جدایه های *آلترناریا تنئویسیما* و ١٢/٥ درصد از جدایه های *آلترناریا پوری* با تشابه ٩٩ درصد به ترتیب در زیر شاخه های I، II، IV، VII *دسته* بندی شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست امده نشان داد که ژن *Alt a1* در کلیه گونه های مورد بررسی *آلترناریا* حضور دارد و اختلافات موجود در توالی ژن مذکور می تواند بیانگر اهمیت نقش نوع گونه و جدایه های *آلترناریا* در القاء پاسخ های آلرژیک در افراد مستعد ابتلا بویژه مبتلایان به آسم آلرژیک باشد.

کلمات کلیدی : گونه های آلترناریا، آلرژن، تنوع، ژن *Alt a1*، تهران

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

قارچها ارگانیسم‌هایی هستند که در تمامی نقاط دنیا پراکنده هستند و به همین دلیل، تماس با آن‌ها امری اجتناب ناپذیر است. مطالعات گسترده ای در رابطه با حضور عوامل آئروآلرژن قارچی در دنیا صورت گرفته است (۶-۱). در حال حاضر، حدود ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار گونه قارچ شناسایی شده اند که در این میان، تنها تعداد ۸۰ گونه بعنوان آئروآلرژن شناسایی گردیده اند و نقش آنها در اتیولوژی موارد آلرژی در انسان به اثبات رسیده است (۱). شیوع آلرژی های تنفسی قارچی، حدود۲۰ تا ۳۰٪ در افراد مبتلا به آتوپی و۱۳/۱۴٪ در کل جمعیت سطح جهان برآورد شده است (۱). مهمترین تظاهرات آلرژیک ناشی از قارچها، شامل آسم، رینیت و آلرژی ریوی - برونشی می باشد. ایجاد عوارض آلرژیک به نوع و تعداد قارچهای موجود در هوا بستگی دارد (۱ و ۷-۹). اجزای قارچی موجود در هوا، می‌توانند آغازگر واکنش‌های آلرژی زا باشند، نشانه های آلرژی های قارچی مانند سایر آلرژی‌هایی است که نسبت به آلرژن‌های محیطی دیگر ایجاد می‌شود (۲-۶). از معروف‌ترین جنس‌های قارچی ایجاد کننده آلرژی می توان به آلترناریا، آسپرژیلوس و کلادوسپورریوم‌ها اشاره کرد که تقریبا در هوای

تمام نقاط دنیا حضور آنها به اثبات رسیده است و بعنوان مهمترین عوامل ایجاد کننده آسم و رنیت آلرژیک شناخته شده‌اند (**۱، ۹-۷**). آلترناریاها پس از آسپرژیلوس‌ها و کلادوسپوریوم‌ها به عنوان شایع ترین عوامل قارچی موجود در هوا گزارش شده‌اند و گزارشات متعددی مبنی بر بروز آسم و آلرژی بدنبال برخورد با آنها وجود دارد (**۱۱-۱**). آنها بعنوان فلور قارچی تقریبا در محیط زیست اطراف اعم از هوا، خاک، اب و بعبارتی در همه جا یافت می شوند. اسپورهای آلترناریا می‌توانند مسافتی به اندازه صدها مایل از منبع اصلی خود فاصله بگیرند، ولی معمولا انقدر بزرگ هستند که نمی‌توانند به آلوئول‌های ریه راه پیدا کنند و به همین دلیل عمدتا بعنوان عوامل آلرژی زا و نه عفونت زا عمل می کنند (**۱، ۱۱**). از مهمترین آلرژن های *آلترناریا* که توسط گونه های آلترناریا از جمله قارچ *آلترناریا آلترناتا* تولید میشود، می توان به پروتئین Alt a1 اشاره کرد که برخورد با ان منجر به تحریک سیستم ایمنی و ایجاد آسم میگردد (**۱۰، ۱۷-۱۲**). این پروتئین یک دایمر با وزن ملکولی ۲۹ کیلودالتون است که از زیر واحد های ۱۶ و ۱۴/۵ کیلودالتونی تشکیل شده است (**۱۳**). ژن *Alt a1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سایر گونه‌های *آلترناریا* نیز شناسایی شده است و توالی انتهائی اسید آمینه این پروتئین بدست آمده است و زیر واحد های آن کلون شده اند (**۱۴**). با اینحال اهمیت این گونه ها هنوز در بروز موارد آلرژی در انسان نامشخص است. همچنین چندین شاخص آنتی ژنیک مشترک بین قارچهای *آلترناریا* و *استمفیلوم* دیده شده است که قادر به اتصال به آنتی بادی IgG میباشد و Alt a1 به عنوان یک آلرژن اصلی در بین این دو جنس قارچی شناسائی گردیده است (**۱۵**). محققین مختلف، پروتئین های شبه Alt a1 را در برخی از گونه های خانواده پلئوسپوراسه شامل *بوتریتیس*، *استمفیلیوم*، *کورولاریا* و *اولوکلادیوم* بر اساس واکنش عصاره های قارچی با آنتی بادی اختصاصی ضد *Alt a1* نوترکیب شناسایی کرده اند و چنین استنباط می‌شود که این شبه پروتئین ها نیز بتوانند همانند *Alt a1* در ایجاد آلرژیهای قارچی در انسان دخالت داشته باشند (**۱۹-۱۵**).

نشان داده شده است که تعیین توالی ژن های درگیر در تولید آلرژن های قارچی و مقایسه توالی های حاصل در جهت بررسی اختلافات ناشی از توالی ها در جهت تغییر در ساختار آنتی ژنیک پروتئین های آلرژن با توجه به شباهت های بین و درون گونه ای، در تعیین الگوی پاسخ جمعیتی در برخورد با این آنتی ژن های قارچی دارای اهمیت بسزایی است. Hong و همکاران با مطالعه ۵۲ گونه آلترناریا و جنس های وابسته نشان دادند که آنالیز هومولوژی ژن *Alt a1* میتواند در گروه بندی گونه های آلترناریا بطور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گیرد. هر چند این محققین نشان دادند که نتایج آنها نتوانسته است ارتباط بین و درون گونه‌یِ سویه های آلترناریا را بطور کامل مورد حل و فصل قرار دهد و ضرورت انجام مطالعات بیشتر بر روی سویه های بدست آمده از مکان های جغرافیایی مختلف را مورد تاکید قرار دادند (**۱۴**). در ایران، علیرغم مطالعات پراکنده انجام شده در خصوص نقش *آلترناریا* در ارتباط با سطح IgE اختصاصی سرمی ضد قارچ و بروز موارد آسم و آلرژی، اطلاعات چندانی در خصوص ارزیابی حضور و میزان هومولوژی ژن های دخیل در تولید آلرژن های *آلترناریا* و نقش آنها در ارزیابی های فیلوژنتیک قارچ در دسترس نمی باشد (**۲۰**).

با توجه به نقش اجتناب نا پذیر آلترناریا ها در بهداشت عمومی بویژه نقش بارز ان در اتیولوژی واکنش‌های آلرژیک در انسان و و فقدان اطلاعات جامع در خصوص الگوی پراکندگی و میزان هومولوژی ژن *Alt a1* در بین گونه های آلترناریا ، تحقیق حاضر با هدف شناسایی، تعیین الگوی پراکندگی و هومولوژی ژن *Alt a 1* بدنبال مقایسه توالی ان در بین آلترناریا های جداسازی شده از نمونه هوای استان تهران برای اولین بار در ایران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه های قارچی

در این مطالعه، تعداد ۴۸ جدایه آلترناریا متعلق به گونه های *آلترناریا آلترناتا* (۳۳/۴٪)، *آلترناریا سولانی* (۲۳٪)، *آلترناریا تنئویسیما* (۲۳٪)، *آلترناریا پوری* (۱۶/۶٪) و *آلترناریا براسیکولا* (۴٪) که از نمونه هوای مناطق ۲۲ گانه شهر تهران جداسازی و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک و مولکولی با استفاده از تعیین توالی ژن ITS شناسایی و تفریق شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت قارچ و استخراج DNA

یک قطعه از کلنی های هر یک از جدایه های متعلق به ۵ گونه‌ی آلترناریا در پلیت های حاوی محیط سابورو دکستروز آگار

(SDA, Merck) تلقیح گردید و کشت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیووس نگهداری شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، سوسپانسیون اسپور با استفاده از افزودن آب مقطر استریل حاوی ۰/۱٪ توئین ۸۰ تهیه گردید و تعداد اسپورها با استفاده از لام نئوبار شمارش شد.

جهت استخراج DNA قارچ، میزان ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچ خالص، با غلظت ۱×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر به هر یک از ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت سابورو دکستروز مایع افزوده شد. ارلن ها به مدت ۷ روز، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و توده میسلیومی تشکیل شده، با استفاده از کاغذ واتمن از محیط کشت جداسازی گردید و به داخل لوله‌های فالکون استریل ۵۰ میلی لیتری منتقل شد. عناصر قارچی با افزودن آب مقطر استریل شستشو داده شد و توده میسلیوم‌های شسته شده جهت استخراج DNA در هاون چینی استریل در مجاورت نیتروژن مایع بصورت پودر تبدیل شد و به همراه ۵-۲ میلی‌لیتر بافر لیز کننده (محتوی تریس هیدروکلراید ۱۰ میلی مولار با pH برابر ۸، اتیلن دی امین تترا استیک اسید ۱۰ میلی مولار، SDS ۱۰٪ و کلرید سدیم ۰/۵ مولار)، بطور کامل هموژن گردید. مخلوط حاصل به لوله های فالکون ۱۵ میلی لیتری منتقل گردید و ۳ میلی لیتر محلول فنل- کلروفرم (۱:۱) بدان افزوده شد و پس از انجام عمل سانتریفوژ با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴º C، مایع رویی از رسوب جدا شد. استخراج DNA قارچ های مورد بررسی با استفاده از افزودن ایزوپروپانل (۰/۶ حجم محلول رویی) و نگهداری در دمای ۲۰ - º C به مدت ۱ ساعت صورت گرفت. محلول حاصل با دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴º C سانتریفوژ گردید و رسوب بدست آمده با استفاده از ۵ میلی لیتر اتانل ۷۰٪ شستشو داده شد و رسوب حاصل خشک گردید (۲۱).

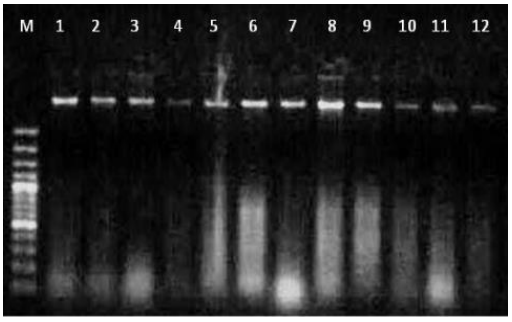
بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده

جهت بررسی کمی و خلوص DNA جدایه های آلترناریا ی مورد بررسی، از دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000C (Thermo Fisheries Scientific Inc. USA) با طول موج ۳۴۰ نانومتر استفاده شد و میزان غلظت DNA نمونه‌های مورد بررسی با توجه به منحنی‌های مربوطه و نسبت جذب‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. جهت بررسی کیفیت و اطمینان از استخراج DNA نمونه‌های مورد بررسی، از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد با جریان ۱۰۰ ولت استفاده گردید.

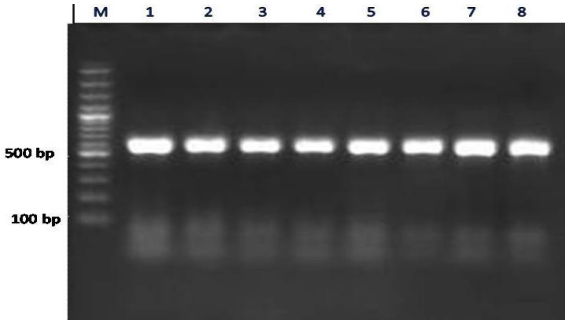
بررسی حضور ژن *Alt a 1* و مقایسه توالی آن در بین آلترناریا ی های جداسازی شده

جهت بررسی حضور ژن *Alt a 1* و تکثیر آن، از کیت Master mix شرکت سیناکلون و با استفاده از پرایمر های Alt-for (5-ATGCAGTTCACCACCATCGC-3)، Alt-rev (5-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3) بر اساس پروتکل پیشنهاد شده استفاده گردید. میزان ۱ میکرولیتر از DNA های استخراج شده، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمر های رفت و برگشت (با غلظت۲۰ پیکو مول) و ۱۲/۵ میکرولیتر از Master mix به یکدیگر اضافه گردید و حجم نهایی با استفاده از آب مقطر به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد و مخلوط حاصل در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد. برنامه حرارتی بصورت یک سیکل ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۲۵ سیکل ۹۴° C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴°C به مدت ۴۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۵۰ دقیقه و یک سیکل ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه اجرا گردید. جهت رویت نتیجه واکنش ۵ میکرولیتر از محصول PCR بدست آمده با ۳ میکرولیتر بافر بار گذاری مخلوط گردید و با استفاده از ژل اگارز ۱ درصد، درون تانک حاوی بافر TBE با ولتاژ۱۰۰ به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. ژل الکتروفورز شده با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و جهت بررسی حضور باند های تشکیل شده و عکس برداری از آنها به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل گردید. حضور و اندازه ی قطعه ی حاصل با مقایسه با اندازه مارکر DNA بررسی گردید و پس از اطمینان از تکثیر قطعه ی مورد نظر ۲۰ میکرولیتر حجم باقیمانده محصول PCR در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتر جهت تعیین توالی توسط هر دو پرایمر رفت و برگشت با استفاده از تکنیک Big Dye Reaction توسط کمپانی Bioneer به شرکت ارسال گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده از زنجیره های رفت و برگشت هر یک از گونه های آلترناریا جداسازی شده از هوا به منظور ویرایش در برنامه Bioedit و Finch TV بررسی شد و در نهایت با استفاده از نرم افزار BLASTn با توالی های ثبت شده در بانک ژنی (GenBank) مورد مقایسه و آنالیز قرار گرفت. با توجه به اطلاعات ثبت شده دررابطه با ژن *Alt a1* در پایگاه داده های NCBI، توالی‌های با تشابه بالا (۱۰۰-۹۹ درصد) انتخاب گردید و همولوژی ژن مذکور در بین گونه های آلترناریا جداسازی شده با

استفاده از نرم افزار Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5.0: MEGA5 با توجه به رسم دندروگرام حاصل، مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.



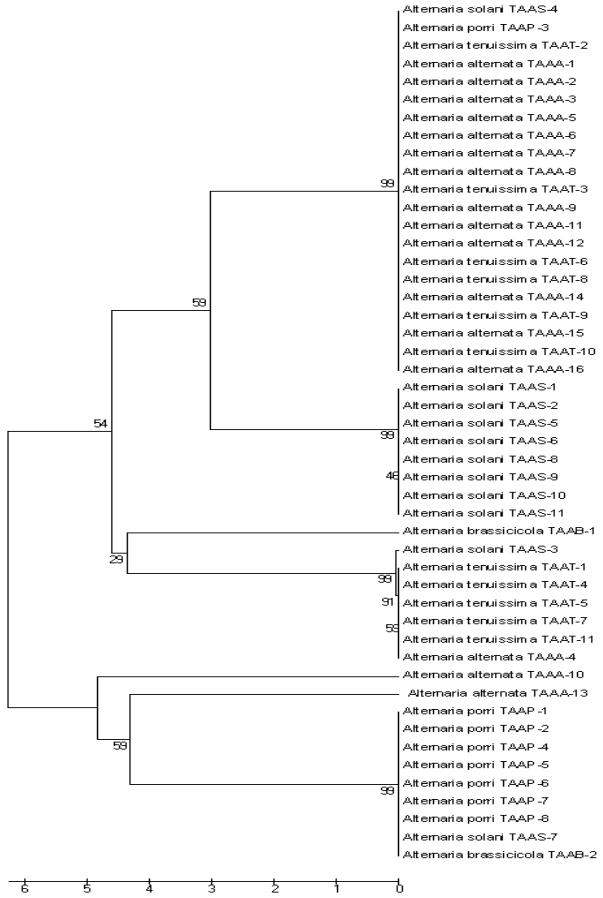
شکل ۱: آنالیز DNA جدایه های آلترناریا بر روی ژل آگارز ۱٪ (ستون های ۱ الی ۱۲)، ستون M، حاوی مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز



شکل ۲: نتایج PCR مربوط به تکثیر ژن *Alt a1* در جدایه‌های *آلترناریا آلترناتا* (ستون های ۱و۲) ، *آلترناریا سولانی* (ستون های ۳و۴)، *آلترناریا تنئویسیما* (ستون های۶ و ۵)، آلترناریا پوری (ستون ۷) و *آلترناریا براسیکول* (ستون ۸)، ستون M حاوی مارکر DNA 100جفت باز

یافته‌ها

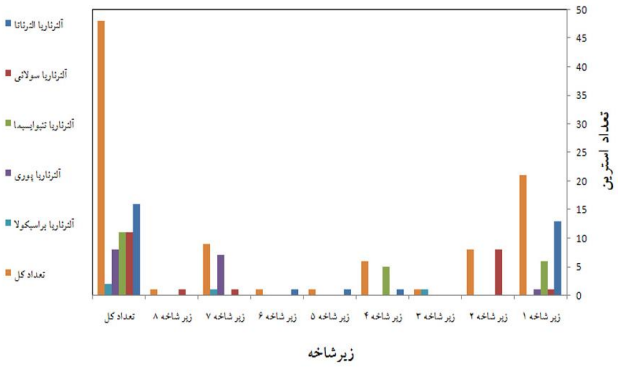
غلظت و خلوص DNA های استخراج شده از جدایه‌های آلترناریا بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ تعیین گردید و غلظت ۲۵ نانو گرم به ازاء هر میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها تهیه شد. حضور DNA های استخراج شده بدنبال انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد تأئید قرار گرفت (شکل ۱). بدنبال انجام عمل PCR و تکثیر ژن*Alt a1* در ایزوله‌های مورد بررسی، تمامی ایزوله ها یک باند با اندازه ی تقریبی ۶۰۰-۵۰۰ bp را نشان دادند. شکل ۲ نمونه ای از الکتروفورز محصولات PCR ژن *Alt a1* مربوط به چند جدایه از آلترناریا را نشان می دهد. چنانچه در شکل مشاهده می شود، اندازه ی قطعه تکثیر شده در بین آلترناریا های مورد بررسی کاملاً یکسان می باشند.



شکل ۳: دندروگرام حاصل از بررسی ارتباط فیلوژنیک جدایه‌های *آلترناریا* براساس تعیین توالی ژن Alt a1

تعیین توالی ژن *Alt a 1* در ایزوله های آلترناریا بدنبال مقایسه با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI با استفاده از نرم افزار Blast (Basic Logical Alignment Search Tool) انجام گرفت. توالی‌های بدست آمده متعلق به هر یک از گونه‌های آلترناریا که دارای تشابه ۱۰۰-۹۹ درصد با توالی های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنی بودند به فرم FASTA ذخیره شدند. دندروگرام مربوط به ارتباط فیلوژنیک گونه‌های آلترناریا بر اساس توالی ژن *Alt a1* با استفاده از توالی‌های ذخیره شده با استفاده از نرم افزار MEGA5 آنالیز و ترسیم گردید (شکل ۳). بر اساس نتایج حاصل از رسم دندروگرام مبتنی بر همولوژی ژن مذکور، جدایه‌های متعلق به گونه‌های *آلترناریا آلترناتا* در ۴ زیر شاخه، *آلترناریا براسیکولا* در ۲ زیر شاخه، *آلترناریا پوری* در ۲ زیر شاخه، *آلترناریا تنئویسما* در ۲ زیر شاخه و *آلترناریا سولانی* در ۴ زیر شاخه، مجزا طبقه بندی شدند (نمودار ۱). حدود ۸۱٪ جدایه های *آلترناریا آلترناتا* ، ۹٪ جدایه های *آلترناریا سولانی*، ۵۴٪ *آلترناریا تنئویسما*، ۱۲/۵٪ جدایه های *آلترناریا پوری* با ۹۹٪

قرابت در زیر شاخه I دسته بندی شدند. در حالیکه حدود ۷۳٪ از جدایه های *آلترناریا سولانی* با ۹۹٪ قرابت در زیر شاخه II قرار گرفتند. یک جدایه *آلترناریا سولانی* (۹٪) به تنهایی در زیر شاخه VIII و جدایه ی دیگر به همراه جدایه های *آلترناریا براسیکولا* (۵۰٪)، *آلترناریا پوری* (۸۷/۵٪) با قرابت ۹۹٪ در زیر شاخه VII طبقه بندی شدند. جدایه های *آلترناریا تنئویسما* (۴۵/۵٪) و *آلترناریا آلترناتا* (۶٪) با قرابت ۹۹٪ در زیر شاخه VI و دو جدایه *آلترناریا آلترناتا* (۹٪) با ۵۲ درصد قرابت هر یک در دو زیر شاخه IV و V بطور مجزا قرار گرفتند. همچنین یک جدایه *آلترناریا براسیکولا* (۵۰٪) به تنهایی در زیر شاخه III قرار گرفت که دارای ۵۴٪ قرابت با شاخه های I و II بود.



نمودار ۱: فراوانی سویه های متعلق به گونه های آلترناریای جداسازی شده از هوای تهران در ارتباط با زیر شاخه های بدست امده از تعیین توالی ژن *Alt a 1*

بحث

در تحقیق حاضر، ارتباط فیلوژنیک گونه های آلترناریای جداسازی شده از هوای تهران با استناد به تعیین هومولوژی ژن *Alt a1* مورد ارزیابی قرار گرفت. علی رغم نقش شناخته شده گونه‌های آلترناریا در ایجاد بیماری‌های آلرژیک نظیر آسم، هنوز اطلاعات چندانی در رابطه با شناسایی آلرژن های اصلی این قارچ و بررسی نقش آن‌ها در بروز آلرژی در دسترس نمی‌باشد. همچنین مطالعات اندکی در رابطه با شناسایی مولکولی آلرژن های این قارچ از جمله Alt a 1 صورت گرفته است. استفاده از روش های ملکولی توانایی محققین را در بالا بردن کیفیت تولید الرژن های الترناریا و روش های ارزیابی و شناسایی مکانیسم های حساسیت به انها افزایش داده است (۲۶-۲۲). Hong و همکارانش پروتئین Alt a1 را بعنوان مهمترین آلرژن آلترناریا از ۵۲ جدایه آلترناریا جدا شده کرده و تعیین توالی ژن های درگیر در تولید ان و ارتباط فیلوژنیک ژن مذکور در گونه‌های مورد مطالعه شامل *آلترناریا اینفکتوریا*، *آلترناریا پوری*، *آلترناریا براسیکولا* و *آلترناریا رادیسینا* مورد ارزیابی قرار دادند (۱۴). آنها نشان دادند که علی رغم اختلافات در میزان آمینو اسید های Alt a1 در گونه های مورد بررسی، ارتباط و شباهت بسیار بالایی از نظر ساختمان ثانویه این پروتئین در اغلب جدایه ها مشاهده می شود (۱۴). با این حال، این محققین نشان دادند که نتایج آنها نتوانسته است ارتباط بین و درون گونه ای سویه های آلترناریا را بطور کامل مورد حل و فصل قرار دهد و ضرورت انجام مطالعات بیشتر بر روی سویه های بدست آمده از مکان‌های جغرافیایی مختلف را مورد تاکید قرار دادند. Burn و همکاران در رابطه با بررسی ارتباط فیلوژنیک نواحی ITS ، گلیسر آلدهید – ۳ فسفات دهیدروژناز (gpd) و Alt a1 در چهار گونه *آلترناریا دایوسی* (۱۰ جدایه)، *آلترناریا پوری* (۶ جدایه)، *آلترناریا سولانی* (۱۰ جدایه) و *آلترناریا توماتوفیلا* (۱۰ جدایه) نشان دادند که تفریق گونه های *آلترناریا سولانی*، *آلترناریا پوری* و *آلترناریا توماتوفیلا* بدنبال مقایسه توالی ناحیه ITS براحتی امکان پذیر نمی باشد و براساس مقایسه توالی این ناحیه تنها سه گونه مذکور در یک شاخه مجزا از *آلترناریا دایوسی* قرار می گیرند. درحالی‌که بر اساس مقایسه توالی های نواحی *gpd* و *Alt a 1* جدایه های مربوط به هریک از گونه در ۴ شاخه مجزا قرار گرفتند، هر چند درصد تشابه های بدست آمده برای تمامی چهار گونه معنی دار نبود (۲۷). این نتایج تاکیدی بر اهمیت پروتئین Alt a1 در طبقه بندی و تعیین فیلوژنی گونه های آلترناریا دارد. Runa و همکاران، ارتباطات فیلوژنی و تاکسونومیک *اولوکلادیوم* با برخی از گونه های آلترناریا را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل، قرابت ژنتیکی این جنس و جنس های وابسته نظیر *استمفیلیوم* و *امبلیزیا* را بر اساس توالی ژن *Alt a 1* با گونه های آلترناریای مورد مطالعه شامل *آلترناریا پوری* (با۹۹/۸۴٪ قرابت)، *آلترناریا آلترناتا* (با ۱۰۰٪ قرابت)، *آلترناریا رادیسینا* (با ۸۴/۹۹٪ قرابت)، *آلترناریا براسیکولا* با ۹۵/۱۰٪ قرابت و *آلترناریا اینفکتوریا* با ۶۹/۹۶٪ مورد تایید قرار داد (۲۸).

در تحقیق حاضر الگوی پراکندگی ژن *Alt a1* در بین تعداد ۴۸ جدایه آلترناریا متعلق به گونه های *آلترناریا الترناتا* (۳۳/۴٪)، *آلترناریا سولانی* (۲۳٪)، *آلترناریا تنئوایسیما* (۲۳٪)، *آلترناریا پوری* (۱۶/۶٪) و *آلترناریا براسیکولا* (۴٪) که از نمونه هوای مناطق ۲۲ گانه شهر تهران جداسازی گردیده بودند، بررسی و میزان هومولوژی ژن مذکور در جدایه های بدست آمده مورد

مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز توالی ژن مذکور نشان داد که گونه ها و جدایه های *آلترناریای* مورد بررسی در ۲ شاخه اصلی و ۸ زیر شاخه طبقه بندی گردیدند. نتایج نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه‌های *آلترناریا آلترناتا* در ۴ زیر شاخه، *آلترناریا براسیکولا* در ۲ زیر شاخه، *آلترناریا پوری* در ۲ زیر شاخه، *آلترناریا تنئویسما* در ۲ زیر شاخه و *آلترناریا سولانی* در ۴ زیر شاخه‌ی مجزا طبقه بندی شدند. این نتایج نشان می‌دهد که بررسی هومولوژی ژن *Alt a1* یک روش مناسب در طبقه بندی و ارزیابی ارتباط فیلوژنی بین گونه های نزدیک به هم آلترناریا می-باشد. قرابت داخل گونه ای بالایی در میان گونه های مورد بررسی گزارش گردید و اکثر جدایه های مربوط به یک گونه از قرابت بالای ۹۰ درصد برخوردار بودند. حدود ۸۱٪ از جدایه های *آلترناریا الترناتا*، ۷۳٪ از جدایه های *آلترناریا سولانی*، ۴۵/۵٪ از جدایه های *آلترناریا تنئویسیما* و ۱۲/۵٪ از جدایه های *آلترناریا* پوری با میزان تشابه برابر ۹۹٪ به ترتیب در زیر شاخه های I، II، IV ، VII دسته بندی شدند. هر چند اختلافاتی در جایگاه قرار گیری جدایه های مربوط به گونه های متفاوت در بین نتایج بدست امده مشاهده شد. یک جدایه *آلترناریا پوری* TAAP-3 با سایر جدایه های متعلق به گونه بدنبال تشابه برابر ۹۹٪ با برخی از جدایه های متعلق به گونه های *آلترناتا*، *سولانی* و *تنوئیسیما* مشاهده گردید. همچنین تفاوتهایی در جایگاه جدایه ای از *آلترناریا سولانی* TAAS-4 که با ۹۹٪ قرابت در زیر شاخه متعلق به جدایه های *آلترناریا آلترناتا* و *آلترناریا تنوئیسیما* قرار گرفت و جدایه دیگر متعلق به این گونه TAAS-3 که بطور مجزا در زیر شاخه VIIIجای گرفته است، مشاهده گردید. دو جدایه *آلترناریا آلترناتا* شامل TAAA-13 و TAAA-10 در دو زیر شاخه جدا از هم (V و VI) و سایر جدایه های متعلق به این گونه طبقه بندی شدند. در رابطه با دو جدایه *آلترناریا براسیسیکولا* تفاوت چشمگیری در جایگاه فیلوژنیک مشاهده گردید. یک جدایه *آلترناریا براسیکولا* TAAB-1 (۵۰٪) به تنهایی در زیر شاخه III قرار گرفت و جدایه TAAB-2 با جدایه های متعلق به *آلترناریا پوری* و *سولانی* (VII) حدود ۹۹٪ تشابه داشت. حدود ۸۱٪ سویه های *آلترناریا الترناتا*، ۹٪ *سویه های آلترناریا سولانی*، ۵۴٪ *آلترناریا تنئویسیما*، ۱۲/۵٪ سویه های *آلترناریا پوری* با ۹۹٪ قرابت در زیر شاخه I دسته بندی شدند. درحالی‌که حدود ۷۳٪ از سویه های *آلترناریا سولانی* با ۹۹٪ قرابت در زیر شاخه II قرار گرفتند. سایر سویه های *آلترناریا سولانی* (۹٪) به همراه سویه های *آلترناریا تنئویسما* (۴۵/۵٪) و *آلترناریا آلترناتا* (۶٪) در زیر شاخه VI با قرابت ۹۹٪ و مابقی سویه های *آلترناریا سولانی* (۹٪) به همراه سویه های *آلترناریا براسیکولا* (۵۰٪)، *آلترناریا پوری* (۸۷/۵٪) با قرابت ۹۹٪ در زیر شاخه VII طبقه بندی شدند. دو سویه *آلترناریا آلترناتا* (۹٪) هر یک در دو زیر شاخه V و IV بطور مجزا قرار گرفتند و با یکدیگر ۵۲ درصد قرابت داشتند و یک جدایه *آلترناریا براسیکولا* TAAB-1 (۵۰٪) به تنهایی در زیر شاخه III قرار گرفت. علی رغم اختلافات مشاهده شده در رابطه با میزان تشابه برخی از جدایه‌ها نتایج حاصل حاکی از هومولوژی بالای Alt a1 در جدایه‌های متعلق به یک گونه در مقایسه با سایر گونه‌ها می باشد. اختلافات موجود در توالی ژن مذکور منجر به تنوع در ساختمان پروتئین مربوطه و تغییر در القاء پاسخ های آلرژیک نسبت به آن گردد که این امر بیانگر اهمیت نقش گونه و سویه در بیماری زایی و آلرژی زایی قارچ باشد.

نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر اهمیت گونه‌های آلترناریا را بعنوان یکی از گروه‌های مهم قارچ های آئروآلرژن مورد تاکید قرار داده و نشان داد که آنالیز هومولوژی ژن *Alt a1* می‌تواند در گروه بندی گونه های آلترناریا، بطور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گیرد. این نتایج ضرورت انجام مطالعات بیشتر بر روی سویه‌های بدست آمده از مکان های جغرافیایی مختلف را مورد تاکید قرار داد و نشان داد که ارزیابی نقش گونه‌های آلترناریا و پروتیین Alt a1 در اتیولوژی آسم و آلرژی، در سطح جمعیت می‌تواند در اتخاذ راهکارهای موثر کنترل و درمان موارد آلرژی ها و عفونت های وابسته به این عوامل قارچی راهگشا باشد.

تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر بخشی از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی مصوب دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی آن دانشگاه انجام شده است. نویسندگان از سرکار خانم رازقی کارشناس محترم گروه قارچ شناسی و جناب آقای کروندیان کارشناس محترم گروه بیوتکنولوژی تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Horner W E, Helbling A, Salvaggio J E, Lehrer S B. Fungal allergens. Clin Microbiol Rev 1995; 8(2): 161–79.

2. Green BJ, Sercombe JK, Tovey ER. Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. J Allergy Clin Immunol 2005;115:1043–8.

3. Shelton BG, Kirkland KH, Flanders WD, Morris GK. Profiles of airborne fungi in buildings and outdoor environments in the United States. Appl Environ Microbiol 2002;68:1743–53.

4. Dharmage S, Bailey M, Raven J, Mitakakis T, Thien F, Forbes A. Prevalence and residential determinants of fungi within homes in Melbourne, Australia. Clin Exp Allergy 1999;29:1481–9.

5. Shams-Ghahfarokhi M, Aghaei-Gharehbolagh S, Aslani N, Razzaghi-Abyaneh M. Investigation on distribution of airborne fungi in outdoor environment in Tehran, Iran. J Environ Health Sci Eng 2014;12(1):54-60.

6. Sepahvand A, Shams-Ghahfarokhi M, Allameh A, Razzaghi-Abyaneh M. Diversity and distribution patterns of airborne microfungi in indoor and outdoor hospital environments in Khorramabad, Southwest Iran. Jundishapur J Microbiol 2013;12:186–92.

7. Black PN, Udy AA, Brodie SM. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. Allergy 2000;55:501–4.

8. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. J Allergy Clin Immunol 2004;113:227–34.

9. Cantani A, Ciaschi V. Epidemiology of *Alternaria alternata* allergy: a prospective study in 6840 Italian asthmatic children Eur Rev Med Pharmacol Sci 2004; 8: 289–94

10. Vailes L, Sridhara S, Cromwell O, Weber B, Breitenbach M, Chapman M. Quantitation of the major fungal allergens, Alt a 1 and Asp f 1, in commercial allergenic products. J Allergy Clin Immunol 2001;107:641–6.

11. Pulimood TB, Corden JM, Bryden C, Sharples L, Nasser SN. Epidemic asthma and the role of the fungal mold *Alternaria alternata*. J Allergy Clin Immunol 2007; 120(3): 610–7.

12. Twaroch TE, Arcalís E, Sterflinger K, Stöger E, Swoboda I, Valenta R. Predominant localization of the major *Alternaria* allergen Alt a 1 in the cell wall of airborne spores. J Allergy Clin Immunol 2012; 129(4) : 1148–9.

13. Chruszcz M, Chapman MD, Osinski T, Solberg R, Demas M, Porebski PJ, Majorek KA, Pomés A, Minor WJ. *Alternaria alternata* allergen Alt a 1: a unique β-barrel protein dimer found exclusively in fungi. Allergy Clin Immunol. 2012; 130(1):241-7.

14. Hong SG, Cramer RA, Lawrence CB, Pryor BM. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure. Fungal Genetics Biol. 2005; 42(2): 119–29.

15. Gutiérrez-Rodríguez A, Postigo I, Guisantes JA, Suñén E, Martínez J. Identification of allergens homologous to Alt a 1 from *Stemphylium botryosum* and *Ulocladium botrytis*. Med Mycol 2011; 49(8): 892-6.

16. Sáenz-de-Santamaría M, Postigo I, Gutierrez-Rodríguez A, Cardona G, Guisantes JA, Asturias J, Martínez J. The major allergen of *Alternaria alternata* (Alt a 1) is expressed in other members of the Pleosporaceae family. Mycoses 2006; 49(2):91-5.

17. Abebe M, Kumar V, Rajan S, Thaker A, Sevinc S, Vijay HM. Detection of recombinant Alt a1 in a two-site, IgM based, sandwich ELISA opens up possibilities of developing alternative assays for the allergen. J Immunol Methods 2006; 312(1-2):111-7

18. Asturias JA, Arilla MC, Ibarrola I, Eraso E, González-Rioja R, Martínez A. A sensitive two-site enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of the major Alternaria alternata allergen Alt a 1. Ann Allergy Asthma Immunol 2003; 90 (5):529-35.

19. Teifoori F, Shams-Ghahfarokhi M, Eslamifar A, Moinazad-Tehrani M, Mashayekhi P, Razzaghi-Abyaneh M. Study on the role of *Alternaria alternata* in the etiology of allergic asthma in patients admitted to Loghman Hospital by using the skin prick test and solid-phase immunoassay. Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology* 2013;16(2): 1-12.

20. Asturias JA, Ibarrola I, Ferrer A, Andreu C, López-Pascual E, Quiralte J, Florido F, Martínez A. Diagnosis of *Alternaria alternata* sensitization with natural and recombinant Alt a 1 allergens. J Allergy Clin Immunol 2005;115(6):1210-7.

21. Pryor BM, Gilbertson RL. Molecular phylogenetic relationships amongst Alternaria species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU

rDNA sequences. Mycological Res 2000; 104(11): 1312-21.

22. Simon-Nobbe B, Denk U, Poۏll V, Rid R, Breitenbach M. The Spectrum of Fungal Allergy. Int Arch Allergy Immunol 2008;145:58–86.

23. De Vogue MW, Thaker AJ, Curran IHA, Zhang L, Muradia G, Rode H. Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternate* Alt a 1 subunit. Int Arch Allergy Immunol, 111 (1996), pp. 385–395

24. Kurupa VP., Vijayc HM, Kumarc V, Castilloa L, Elmsa N. IgE binding synthetic peptides of Alt a 1, a major allergen of *Alternaria alternata*. Peptides 2003; 24 (2003): 179–85.

25. Sanchez H, Bush RK. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. Rev Iberoam Micol. 2001;18(2):56-9.

26. Hu J, Chen C, Peever T, Dang H, Lawrence C, Mitchell T. Genomic characterization of the conditionally dispensable chromosome in Alternaria arborescens provides evidence for horizontal gene transfer. BMC Genomics. 2012; 13:171.

27. Burn S, Madrid H, Gerrits Van Den Ende B, Anderson B, Marinach-Patrice C, Mazier D, De Hoog GS. Multilocus phylogeny and MALDI-TOF analysis of the plant pathogenic species *Alternaria dauci* and relatives. Fungal Biol 2013;117(1):32-40.

28. Runa F, Park MS, Pryor BM. Ulocladium systematic revisited: phylogeny and taxonomic status. Mycol Progress 2009;8:35-47.