

تعیین موقعیت تاکسونومیک و فیلوژنتیک گونه رینوکلادیلا مکنزیی (رامیکلریدیوم مکنزیی)، عامل ایجاد آبسه مغزی در انسان

مهدی ارزنلو

استادیار گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران E-mail: arzanlou@hotmail.com

چکیده

زمینه و هدف: برخی از گونه های قارچی متعلق به مخمرهای سیاه به عنوان یکی از عوامل ایجاد آبسه مغزی در انسان محسوب می شوند. این بیماری محدود به منطقه خاورمیانه بوده است و تاکنون از کشورهای عربستان سعودی، یمن، فلسطین اشغالی و قطر گزارش شده است. بیماری مذکور تاکنون از ایران گزارش نشده است و یا در صورت وجود ناشناخته باقی مانده است. عامل این بیماری تحت عنوان گونه رامیکلریدیوم مکنزیی نامگذاری شده است که متعلق به راسته کتوتریالز می باشد. اغلب اعضای این راسته پاتوژن های فرصت طلب بر روی انسان و حیوانات به شمار می روند که دامنه وسیعی از عفونت ها شامل کروموبلاستومایکوزیس (عفونت های قارچی پوستی و زیر پوستی)، عفونت و آبسه مغزی را ایجاد می کنند. شناسایی اعضای این راسته بر پایه خصوصیات مورفولوژیک مرحله غیر جنسی استوار می باشد و جنس های رامیکلریدیوم، رینوکلادیلا، اگزوفی یالا، ورونثا، کلادوفیالیوفورا را شامل می شوند. برخی از جنس های واقع شده در این راسته از نظر مورفولوژیک با دیگر جنس های قارچی که از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار نبوده و یا بر روی گیاهان ایجاد بیماری می کنند مشابه می باشند و حدود و ثغور مورفولوژیک این جنس ها از همدیگر مشخص نیستند. شناسایی دقیق و صحیح گونه های بیماریزا بر روی انسان در کلینیک ها و آشیان های اکولوژیک آنها در اکوسیستم های طبیعی نقش عمده ای در فهم ما از اکولوژی این گروه از قارچ ها ایجاد خواهد کرد.

روش کار: در این پژوهش ۲۴ جدایه متعلق به ۱۵ گونه از سه جنس رامیکلریدیوم، رینوکلادیلا و ورونثا مورد بررسی مورفولوژیک و مولکولی واقع شدند. خصوصیات مورفولوژیک بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار و با استفاده از تکنیک کشت لام بررسی شد. جهت مطالعه روابط فیلوژنتیکی بین جدایه ها، دو ناحیه ژنومی شامل بخشی از ناحیه (Internal Transcribed Spacer) ITS (ITS-rDNA) و بخشی از زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی (LSU-rDNA) با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر و محصولات واکنش پی سی آر تعیین توالی شدند و درختچه فیلوژنتیک ترسیم گردید.

یافته ها: درختچه فیلوژنتیک حاصل از زیر هم چینی توالی های نوکلئوتیدی، جدایه های مورد بررسی را در دو خوشه اصلی قرار می دهد. بر روی درخت فیلوژنتیک، خوشه اول جدایه های رینوکلادیلا و ورونثا به همراه گونه رامیکلریدیوم مکنزیی و گونه های رامیکلریدیوم فسیکولاتا، رامیکلریدیوم آنسپس و رامیکلریدیوم بیسی تونا را شامل می شود که در راسته کتوتریالز واقع می شوند. خوشه دوم گونه تیپ جنس رامیکلریدیوم (رامیکلریدیوم اپی کولاتوم) به همراه دیگر گونه های رامیکلریدیوم که بر روی گیاهان ایجاد بیماری می کنند، را شامل می شد که در راسته کاپنودیالز قرار می گیرند. با در نظر گرفتن داده های فیلوژنتیک، مورفولوژیک و گونه رامیکلریدیوم مکنزیی در راسته کتوتریالز و جنس رینوکلادیلا طبقه بندی می شود.

نتیجه گیری: موقعیت تاکسونومیک و فیلوژنتیک گونه رامیکلریدیوم مکنزیی عامل ایجاد آبسه مغزی در انسان در جنس رینوکلادیلا و راسته کتوتریالز می باشد. استفاده از داده های مولکولی در کنار داده های مورفولوژیک و اکولوژیک جهت شناسایی قارچ های بیماریزا بر روی انسان واقع در راسته کتوتریالز ضروری به نظر می رسد. این بررسی می تواند نقطه شروعی برای بررسی تنوع و اهمیت کلینیکی این گروه از قارچ ها در ایران باشد.

کلمات کلیدی: رامیکلریدیوم مکنزیی؛ رینوکلادیلا؛ آبسه مغزی؛ مخمرهای سیاه

دریافت: ۸۹/۳/۱۰ پذیرش: ۸۹/۶/۱۷

مقدمه

مخمرهای سیاه به گروهی از قارچ‌های هیفومیست با میسلیوم رنگی اطلاق می‌شوند که برخی از اعضای این گروه از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان و دیگر حیوانات برخوردار بوده و بعنوان عوامل بیماریزای فرصت‌طلب به شمار می‌روند.

بیماری‌های ایجاد شده توسط اعضای این گروه شامل کروموبلاستوما میکوزیس (عفونت‌های پوستی و زیر پوستی)، عفونت‌های مغزی تهدید کننده حیات می‌باشند. اغلب گونه‌های بیماریزا بر روی انسان در راسته کتوتریالز قرار گرفته‌اند [۱، ۲]. تولید رنگدانه ملانین و تحمل درجه حرارت‌های بالا دو فاکتور عمده در بیماریزایی اعضای این راسته بر روی انسان به شمار می‌روند. ملانین یک رنگدانه قهوه‌ای تیره و یا سیاه رنگ با وزن مولکولی بالا می‌باشد که در نتیجه پلیمریزاسیون اکسیداتیو ترکیبات فنلی ایجاد می‌شود. رنگدانه ملانین از طریق محافظت سلول‌های قارچی در برابر اکسیدان‌های قارچکش‌ها، ایجاد اختلال در پاسخ‌های دفاعی سلول میزبان و کاهش حساسیت سلول‌های ملانیزه در برابر ترکیبات قارچ‌کش عمل می‌کند. توانایی رشد در درجه حرارت‌های بالا یک فاکتور دیگر در بیماریزایی اعضای این راسته به شمار می‌رود. برخی از اعضای این گروه در درجه حرارت ۶۰ درجه سانتیگراد نیز رشد می‌کنند [۳، ۴].

اعضای این راسته از تنوع مورفولوژیک وسیعی برخوردار می‌باشند. تنها جنس تلئومورف شناخته شده در این راسته جنس کاپرونیا می‌باشد که تولید پریتسیوم کاذب می‌کند [۱، ۲، ۵]. اغلب قارچ‌های واقع شده در این راسته فاقد مرحله تلئومورف بوده و دارای چرخه تولید مثل غیر جنسی می‌باشند و جنس‌های رامیکلریدیوم، رینوکلایدیلا، اگزوفیلیلا، ورونئا، کلادوفیالوفورا و فونسکئا را شامل می‌شوند. برخی از جنس‌های واقع شده در این راسته از نظر مورفولوژیک با دیگر جنس‌های قارچی که از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار نبوده و یا بر

روی گیاهان ایجاد بیماری می‌کنند قابل تشخیص نیستند و حدود و ثغور مورفولوژیک این جنس‌ها از همدیگر مشخص نیستند. بطور کلی در این گروه از قارچ‌ها کنیدی‌ها بر روی کنید یوفورهای آزاد تولید می‌شوند. کنیدیوفورها از هیف‌های رویشی غیر متمایز و یا تا حدودی متمایز می‌باشند. سلولی کنیدیزا اغلب بصورت انتهایی بر روی کنیدیوفور تشکیل شده و به صورت سیمپودیال رشد کرده و تولید یک راکیس با ظاهری دندانه دار می‌نماید. برخی گروه‌ها مانند گونه‌های جنس کلادوفیالوفورا تولید کلایدوسپورهای توتی شکل در محل بافت آلوده می‌نمایند. با این وجود تشخیص این جنس‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک از همدیگر براحتی امکان‌پذیر نیستند. بعنوان مثال خصوصیات مورفولوژیک جنس‌های رامیکلریدیوم، رینوکلایدیلا و ورونئا با همدیگر همپوشانی دارند [۵].

گونه‌های جنس رامیکلریدیوم اغلب ساپروفیت بوده و یا بر روی گیاهان بیماری‌زا هستند در حالیکه گونه‌های جنس رینوکلایدیلا اغلب بصورت پاتوژن‌های فرصت‌طلب بر روی انسان و حیوان یافت می‌شوند. علاوه بر این برخی از گونه‌های جنس رینوکلایدیلا مانند گونه‌های جنس اگزوفی یا دارای رشد مخمری نیز می‌باشند. گونه‌های جنس ورونئا اغلب ساپروفیت بوده ولی برخی اعضای این جنس بعنوان عوامل بیماری‌زا بر روی انسان گزارش شده‌اند. برخی از گونه‌های جنس رامیکلریدیوم از نظر مورفولوژیک مشابه جنس کلادوسپوریوم می‌باشند. گونه‌های جنس کلادوسپوریوم اغلب ساپروفیت و یا همراه بافت‌های گیاهی می‌باشند، با این وجود برخی از گونه‌های این جنس باعث ایجاد آلرژی بر روی انسان می‌شوند [۶، ۵].

با توجه به همپوشانی موجود بین خصوصیات مورفولوژیک رینوکلایدیلا و رامیکلریدیوم، برخی از گونه‌های بیماری‌زا بر روی انسان در جنس رامیکلریدیوم طبقه‌بندی شده‌اند. گونه رامیکلریدیوم

مورفولوژیک به همراه دارد. توالی ژنهای کد کننده پروتئین و ژنهای کد کننده RNA ریوزومی (rDNA) ناحیه ITS-rDNA، زیر واحد کوچک (SSU-rDNA) و زیر واحد بزرگ (LSU-rDNA) جهت تعیین سطح مختلف روابط خویشاوندی در بین قارچ ها مورد استفاده قرار می گیرند [۱۱، ۱۲، ۱۳]، ۵، ۶، ۲. اطلاعات حاصل از توالی نوکلئوتید ها در طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تشخیصی مولکولی عوامل بیماریزا در کلینیک ها بصورت رایج مورد استفاده قرار می گیرند. لذا اهداف پژوهش حاضر شامل (۱) تعیین موقعیت تاکسونومیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی (۲) مطالعه روابط خویشاوندی بین جنس های بیماریزا بر روی انسان با دیگر گروههای قارچی ساپروفیت و یا بیماریزا بر روی گیاهان بودند.

روش کار

مورفولوژی

جدایه های قارچی: جدایه های قارچی مورد استفاده در این تحقیق همراه با منشاء جغرافیایی و میزبان در جدول ۱ لیست شده است.

جهت بررسی خصوصیات مورفولوژیک جدایه ها بر روی محیط کشت عصاره مخمر آگار کشت داده شدند. کشت ها در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۴ روز در شرایط تاریکی نگهداری شدند و مشخصات کلنی شامل نرخ رشد، شکل ظاهری و رنگ کلنی یادداشت گردیدند. به منظور مطالعه ساختارهای میکروسکوپی، از تکنیک کشت لام با اندکی تغییرات استفاده گردید. برای این منظور لام های استریل در داخل تشتک پتری دیش بر روی دو میله شیشه ای U قرار داده شدند و یک بلوک از کلنی در حال رشد قارچ به ابعاد یک سانتیمتر مکعب بر روی لام قرار داده شد و متعاقب آن یک لام استریل در سطح بلوک کلنی قرار داده شد. پس از تشکیل

مکنزی بر روی انسان باعث ایجاد عفونت مغزی منجر به مرگ می شود. این گونه محدود به منطقه خاورمیانه بوده و تاکنون از دیگر نقاط جهان گزارش نشده است. این بیماری از کشورهای عربستان، یمن، فلسطین اشغالی و قطر گزارش شده است. تاکنون ۱۸ مورد از این عفونت قارچی گزارش شده که تمامی موارد منجر به مرگ شده اند. این بیماری اخیراً از کشور هندوستان نیز گزارش شده است [۱۰، ۹، ۸، ۷]. عامل بیماری این گونه بر روی محیط کشت تولید کلنی های کند رشد با ظاهری پنبه ای و به رنگ زیتونی تیره می کند. هیف ها به رنگ قهوه ای روشن بوده و کنیدیوفورهای قارچ از هیف های رویشی غیر قابل متمایز بوده و یا تا حدودی متمایز می باشند. سلول کنیدی را بصورت انتهایی و یا بین هیفی تشکیل می شوند، کنیدی های تک سلولی، قهوه ای روشن، به اشکال استوانه ای تا بیضی شکل دیده می شوند.

بطور کلی تاکسونومی و شناسایی حدود و ثغور قارچ های آنامورفیک با مورفولوژی کم و بیش هم پوشان تلاشی فرا روی قارچ شناسان می باشد. شناسایی دقیق گونه های قارچی ساپروفیت از گونه های بیماریزا بر روی انسان و دیگر حیوانات از نظر کلینیکی از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. در ضمن در مطالعات اکولوژیکی جهت تعیین زیستگاههای طبیعی این قارچ ها، شناسایی دقیق ضروری می باشد [۹، ۵]. امروزه با بهره گیری از پیشرفت های ایجاد شده در زیست شناسی مولکولی، تعیین حدود و ثغور گروههای قارچی و دیگر موجودات زنده به راحتی امکان پذیر می باشد. روش های مبتنی بر DNA مشکلات موجود همراه با روش های کلاسیک شناسایی عوامل بیماریزا را مرتفع می کنند. برعکس روشهای کلاسیک، داده های DNA تحت تاثیر متغیرهای محیطی قرار نمی گیرند. مقایسه توالی های DNA بصورت رایج در مطالعه روابط خویشاوندی قارچ ها مورد استفاده قرار می گیرد و در اغلب موارد نتایج مطمئن تری در مقایسه با خصوصیات

ساختارهای میکروسکوپی قارچ در سطح لامل، لامل از سطح بلوک آگار برداشته شد و لام میکروسکوپی در اسید لاکتیک تهیه و ساختارهای میکروسکوپی قارچ در حالت طبیعی و دست نخورده زیر میکروسکوپ نوری بررسی و تصویر برداری با استفاده از سیستم عکسبرداری دیجیتال انجام گردید [۵].

مطالعات مولکولی:

استخراج DNA: برای این منظور جدایه های قارچی بر روی محیط کشت عصاره مالت آگار بصورت مخطط کشت داده شدند. پس از رشد کلنی قارچ به اندازه کافی، استخراج DNA با استفاده از کیت تجارتي موبیو (MoBio laboratories, USA) مطابق دستورالعمل کارخانه انجام گردید. DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز:

جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغازگرهای ITS1(5TCCGTAGGTGAACCTGCGG3) و ITS4 (5TCCTCCGCTTATTGATATGC3) مورد استفاده واقع شدند که این آغازگرها بخشی از ناحیه ۳ زیر واحد کوچک DNA ریپوزومی (-SSU rDNA)، ناحیه ITS1 و 5.8S، ITS2 و بخشی ناحیه ۵ از زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی (-LSU rDNA) را با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر می کنند [۱۲]. جهت تکثیر بخشی از زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی (-LSU-rDNA)، آغازگرهای RoR(5ACCCGCTGAACCTTAAGC3) و LR5 (5TCCTGAGGGAAACTTCG3) مورد استفاده واقع شدند [۱۳]. مخلوط واکنش زنجیره ای پلی مراز شامل ۰/۵ واحد آنزیم پلی مراز (Taq DNA polymerase)، بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۰/۵ میلی مول کلرید منیزیم (0.5 mM Mgcl2)، ۰/۲ میلی مول از هر یک از dNTP، ۵ پیکو مول از هر یک از آغازگرها و ۱۰ الی ۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم

شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. درجه حرارت دستگاه پس از انجام واکنش بر روی درجه حرارت ۱۰ درجه برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید زیر دستگاه ژل داک بررسی شدند. تعیین توالی: واکنش تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات تکثیر شده با استفاده از کیت تجاری (BigDye 1 terminator v. 3. 1) مطابق دستورالعمل سازنده کیت و با استفاده از دستگاه (ABI Persim 3700) انجام گردید.

فیلوژنی: توالی های خام با استفاده از نرم افزار SeqMan (Lasergene package, DNASTAR) بررسی شده و ویرایش شدند. توالی های ایجاد شده در این بررسی با توالی های موجود در بانک ژن (NCBI Blast Search) مقایسه شده و زیر هم چینی جدایه ها با استفاده از نرم افزار Mega 4 انجام گردید و الگوی هم ترازی چند گانه بررسی و درختچه فیلوژنتیک بر اساس روش پیوست همسایه ها (Neighbor joining) ترسیم گردید و روابط خویشاوندی جدایه ها بررسی شد.

یافته ها

محصول PCR حاصل از تکثیر DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4) و (LR و LROR) حدود ۵۷۰-۵۵۰ جفت باز و حدود ۹۵۰-۹۳۰ جفت باز به ترتیب تکثیر کردند. در این بررسی ناحیه ITS و زیر واحد بزرگ (LSU-rDNA) ۲۴

اینکه درختچه حاصل از توالی های ناحیه ITS کاملا منطبق با درختچه حاصل از توالی های ناحیه زیر واحد بزرگ بود، تنها درختچه فیلوژنتیک حاصل از اطلاعات مربوط به ناحیه زیر واحد بزرگ ارایه گردیده است (شکل ۱).

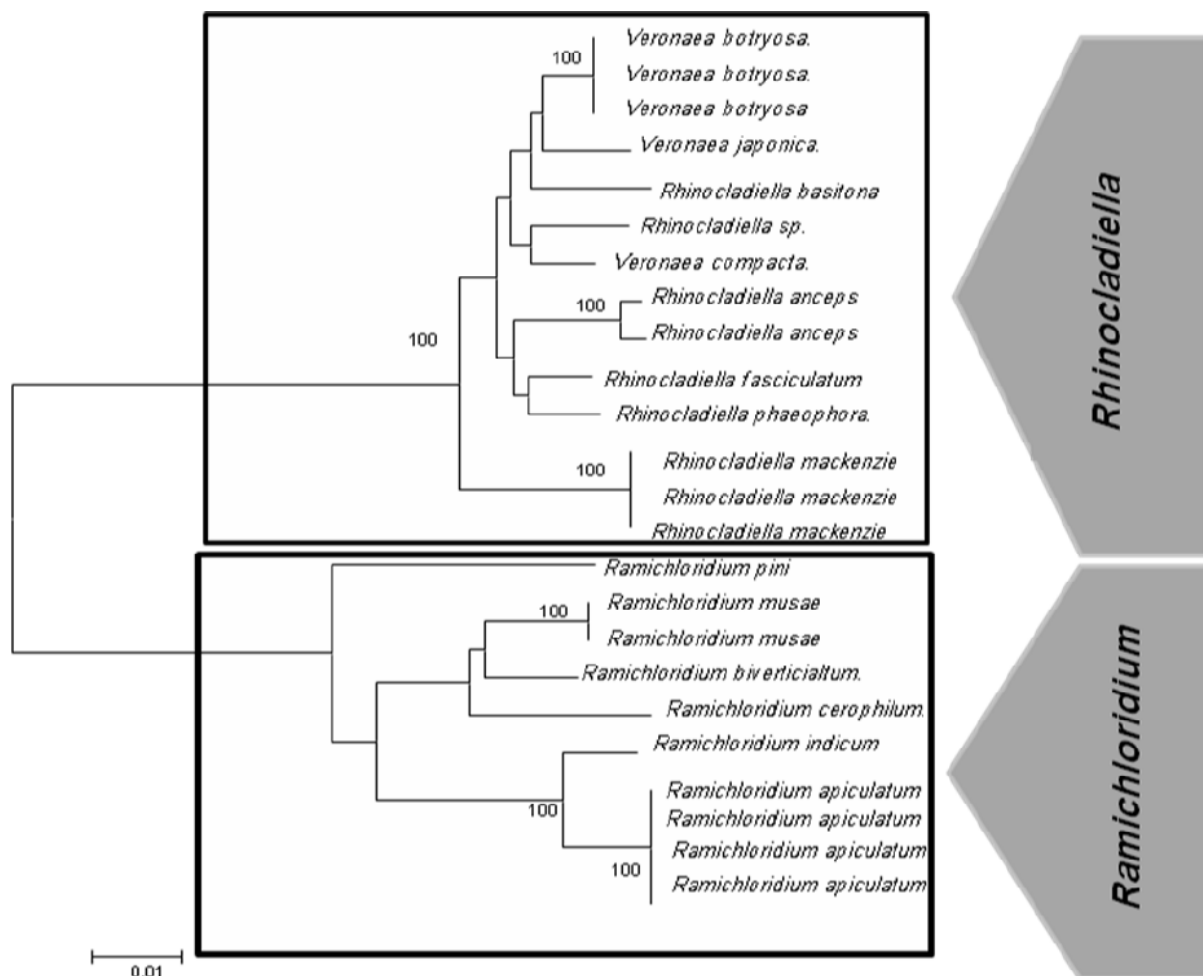
بر روی درخت فیلوژنتیک خوشه اول جدایه های رینوکلادیلا و ورونئا به همراه گونه رامیکلریدیوم مکنزی و گونه های رامیکلریدیوم فسی کولاتا،

جدایه متعلق به ۱۵ گونه مطابق جدول ۱ تعیین توالی گردیدند.

درختچه فیلوژنتیک حاصل از مقایسه توالی های ایجاد شده برای هر گونه و زیر هم چینی آنها و تعیین الگوی همترازی چندگانه با استفاده از توالی های هر دو ناحیه ژنی مورد استفاده براساس مدل نزدیکترین همسایه (neighbor joining)، جدایه های مورد بررسی را در دو خوشه اصلی قرار داد. با توجه به

جدول ۱. لیست جدایه های قارچی مورد بررسی واقع شده در این پژوهش

گونه	میزبان	منشاء جغرافیایی
Ramichloridium apiculatum	خاک	آمریکا
Ramichloridium apiculatum	<i>Cucumis sativus</i>	افریقای جنوبی
Ramichloridium apiculatum	<i>Aloe sp.</i>	افریقای جنوبی
Ramichloridium apiculatum	خاک	پاکستان
Ramichloridium biverticillatum	موز	نامشخص
Ramichloridium musae	موز	نامشخص
Ramichloridium musae	موز	سوری نام
Ramichloridium pini	کاج	انگلستان
Ramichloridium cerophilum	خاک جنگل	برزیل
Ramichloridium indicum	<i>Sasa sp.</i>	ژاپن
Rhinoclaadiella anceps	<i>Fagus sylvatica</i>	فرانسه
Rhinoclaadiella basitona	انسان	ژاپن
Rhinoclaadiella fasciculata	چوب در حال پوسیدن	هندوستان
Rhinoclaadiella phaeophora	خاک	کلمبیا
Rhinoclaadiella sp.	عسل	فرانسه
Rhinoclaadiella mackenziei	انسان	فلسطین اشغالی
Rhinoclaadiella mackenziei	انسان	فلسطین اشغالی
Rhinoclaadiella mackenziei	انسان	امارات متحده عربی
Veronaea botryosa	پهن بز	هندوستان
Veronaea botryosa	نامشخص	ایتالیا
Veronaea botryosa	نامشخص	استرالیا
Veronaea compacta	نامشخص	آفریقای جنوبی
Veronaea japonica	ساقه در حال پوسیدن بمبو	ژاپن



شکل ۱. فیلوگرام حاصل از توالی نوکلئوتیدی ناحیه زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی گونه های بررسی شده در این پژوهش با استفاده از مدل نزدیکترین همسایه. درختچه فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار 4 Maga ترسیم شده است

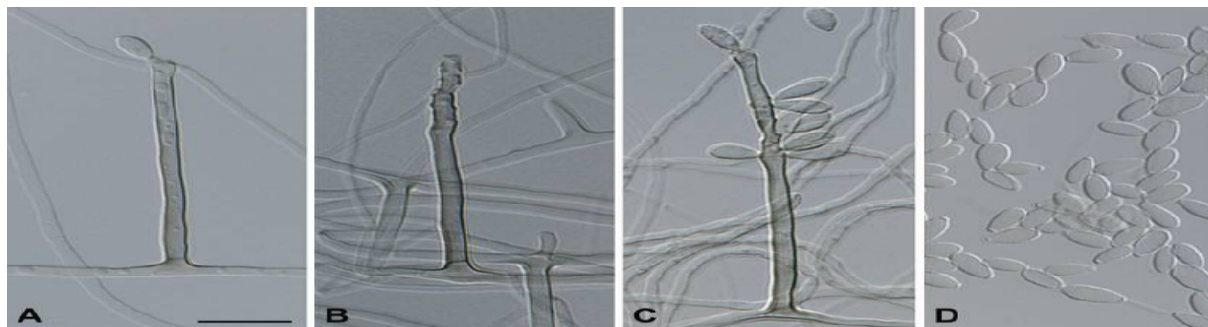
مورفولوژیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی با گونه تیپ جنس رینوکلادیلا (رینوکلادیلا آتروویرنس). جنس رینوکلادیلا یک جنس مناسب برای گونه رامیکلریدیوم مکنزی و دیگر گونه های رامیکلریدیوم واقع شده در راسته کتوتریالزا می باشد. گونه ورونئا بوتریوزا نیز به عنوان عامل عفونت پوستی و زیر پوستی گزارش شده ولی خصوصیات مورفولوژیک این جنس از جنس رینوکلادیلا متفاوت است. جنس ورونئا بواسطه داشتن کنیدی های دوسلولی از دو جنس دیگر یعنی رینوکلادیلا، رامیکلریدیوم براحتی قابل تشخیص است (شکل ۴).

شناسایی رینوکلادیلا، رامیکلریدیوم بر اساس خصوصیات مورفولوژیک براحتی امکان پذیر نیست

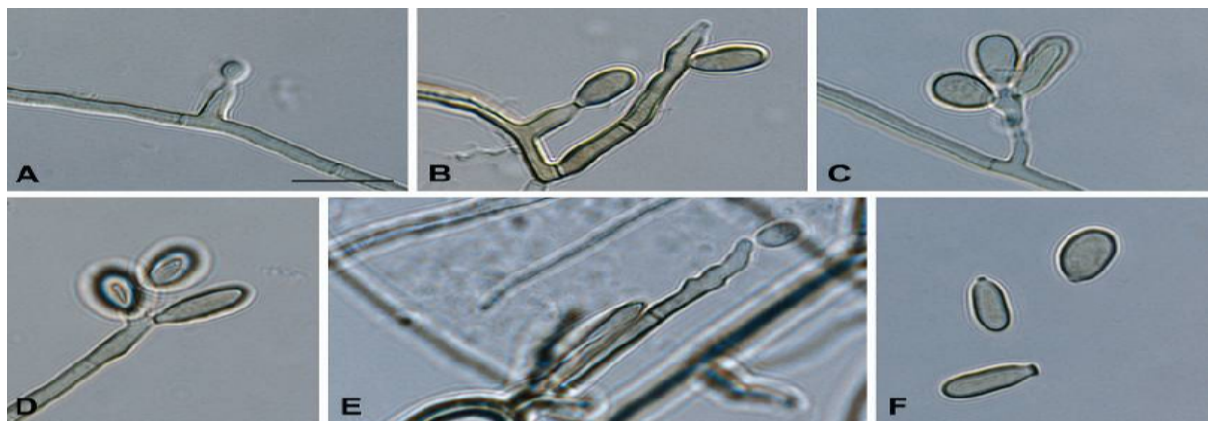
رامیکلریدیوم آنسپس و رامیکلریدیوم بیسی تونا را شامل می شد که در راسته کتوتریالز واقع می شوند. خوشه دوم گونه تیپ جنس رامیکلریدیوم (رامیکلریدیوم اپی کولاتوم) به همراه دیگر گونه های رامیکلریدیوم که بر روی گیاهان ایجاد بیماری می کنند را شامل می شد که در راسته کاپنودیالز قرار می گیرند. از نظر اکولوژیکی اعضای این دو راسته با همدیگر متفاوت می باشند، اغلب گروههای قارچی واقع در راسته کتوتریالز توانایی ایجاد بیماری بر روی انسان را دارند در حالیکه اعضای راسته کاپنودیالز اغلب از میزبان های گیاهی گزارش شده اند. بنابراین با در نظر گرفتن داده های DNA و خصوصیات اکولوژیک و مقایسه خصوصیات

با این وجود، این ویژگی معیار قابل اعتمادی به نظر نمی‌رسد. اعضای هر دو جنس تولیدکننده‌های تک سلولی می‌کنند که بر این اساس نیز نمی‌توان این دو جنس را از همدیگر تشخیص داد. با این وجود

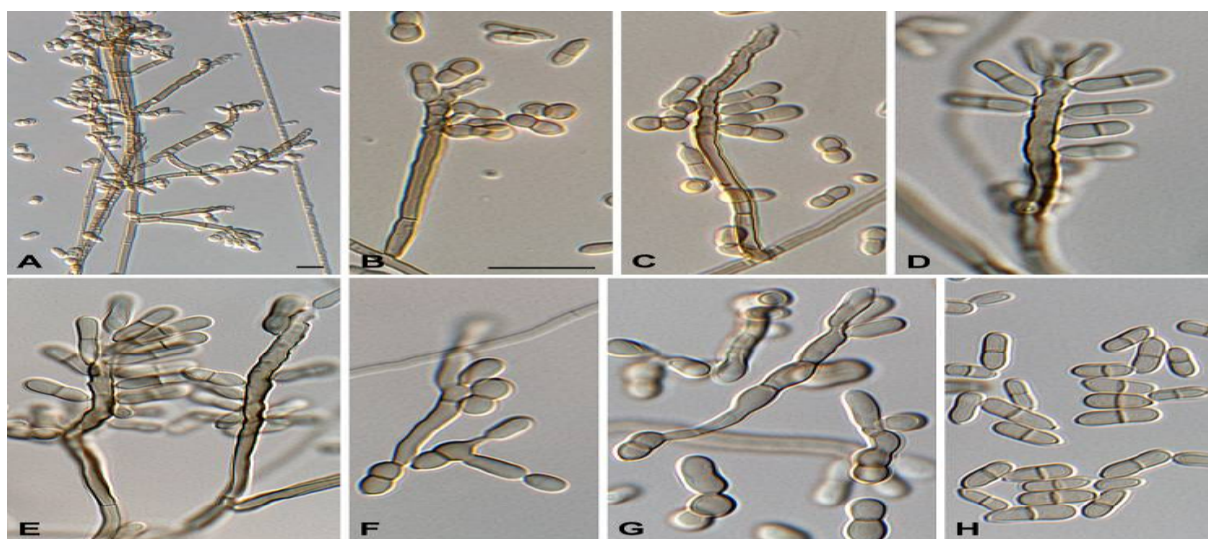
(اشکال ۲ و ۳). در جنس رامیکلریدیوم کنیدیفورهای از هیف‌های رویشی متمایز می‌باشند (شکل ۲) ولی در رینوکلایدیلا کنیدیوفورها از هیف‌های رویشی به سختی متمایز می‌شوند [۳].



شکل ۲. مشخصات میکروسکوپی گونه رامیکلریدیوم اپی کولاتوم، ای، بی، سی: کنیدیوفور و سلول‌های کنیدی‌زا؛ دی: کنیدی



شکل ۳. مشخصات میکروسکوپی گونه رینوکلایدیلا مکنزی، ای، بی، سی، دی و ای: کنیدیوفور و سلول‌های کنیدی‌زا؛ اف: کنیدی



شکل ۴. مشخصات میکروسکوپی گونه وروناتا بوتری یوزا، ای، بی، سی، دی و ای: کنیدیوفور و سلول‌های کنیدی‌زا؛ اف و جی: کنیدی‌های در حال جوانه زنی؛ اچ: کنیدی

این دو جنس با در نظر گرفتن ترکیبی از اطلاعات DNA و اکولوژیکی از همدیگر قابل شناسایی می باشند.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که موقعیت تاکسونومیک و فیلوژنتیک گونه رامیکلریدیوم مکنزیی راسته کتوتریالز می باشد. در این راسته جنس های مختلفی واقع شده اند که مرحله جنسی آنها هنوز کشف نشده اند. تنها جنس تلئومورف شناخته شده در این راسته جنس کاپرونیا می باشد [۵،۲،۱]. لذا گروه بندی این گروه از قارچ ها تاکنون بر اساس خصوصیات مرحله غیر جنسی استوار بوده است. بطور کلی رده بندی گروه های قارچی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک مرحله غیر جنسی منجر به نتیجه گیری های غیر واقعی و گروه بندی های غیر طبیعی می شود. این نتیجه گیری های غیر واقعی می تواند به این خاطر باشد که خصوصیات مورفولوژیک ممکن است از جد مشترک منشأ نگرفته باشند و در نتیجه نیازهای اکولوژیک و تغذیه ای ایجاد شود که اصطلاحاً تکامل همگرا نامیده می شود. بعنوان مثال جنس رامیکلریدیوم و رینوکلادیلا از نظر مورفولوژیک به سختی از یکدیگر متمایز هستند. در حالیکه نتیجه پژوهش حاضر نشان می دهد که این دو جنس در دو راسته مجزا قرار گرفته اند. بنابراین مبنا قرار دادن خصوصیات مورفولوژیک به تنهایی جهت شناسایی این گروه از قارچ ها توصیه نمی شود. جدایه های گونه رینوکلادیلا مکنزیی به صورت یک گروه مجزا در راسته کتوتریالز قرار می گیرند ولی از آنجائیکه معرفی جنس جدید برای قارچ های آنامورف با مورفولوژی کم و بیش مشابه که در داخل یک راسته قارچی توصیه نمی شود، گونه مذکور در جنس رینوکلادیلا که در مقایسه با دیگر جنس ها

از شباهت مورفولوژیک زیادی با این جنس برخوردار بود، طبقه بندی شد (شکل ۱).

با اتکا بر خصوصیات اکولوژیک می توان تا حدودی اعضای این دو راسته را از همدیگر تشخیص داد، ولی با این وجود اغلب گروه های قارچی واقع شده در راسته کتوتریالز از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار هستند برخی گروه ها زندگی ساپروفیتی دارند. این وضعیت در مورد راسته کاپنودیالز هم صدق می کند، اغلب اعضای این راسته با میزبان های گیاهی همراه بوده و یا زندگی ساپروفیتی دارند ولی برخی از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار هستند.

داده های مبتنی بر DNA مشکلات همراه با ویژگی های مورفولوژیک را مرتفع می سازند. زیرا فنوتیپ هر موجود زنده محصول بیان ژنوتیپ آن بوده و با استفاده از اطلاعات DNA در اغلب موارد می توان تغییرات فنوتیکی موجودات زنده را بررسی کرد. داده های مولکولی ابزار مناسبی برای درک روابط فیلوژنتیکی بین موجودات زنده به شمار می روند [۶]. چنانکه نتایج این بررسی نشان داد گونه رینوکلادیلا مکنزیی به راحتی از دیگر گونه های رامیکلریدیوم بر اساس داده های توالی نوکلئوتیدی DNA ریبوزومی شناسایی گردید و موقعیت فیلوژنتیک آن بررسی گردید. با ترکیب داده های DNA با خصوصیات مورفولوژیک و اکولوژیک و دیگر خصوصیات افتراقی بین گروه های قارچی می توان نتایج مطمئن تری کسب کرد. به نظر می رسد که در آینده روش های ترکیبی در شناسایی و رده بندی قارچ ها بیشتر مورد استفاده شوند.

نکته جالب در مورد گونه رینوکلادیلا مکنزیی این است که این گونه محدود به خاورمیانه می باشد و تاکنون از کشورهای معدودی گزارش شده است که می توان به عربستان سعودی، یمن و قطر اشاره کرد [۱۰، ۹، ۸، ۷]. اغلب قربانیان این قارچ، افراد دارای ضعف سیستم ایمنی بوده اند [۹، ۸]. اینکه این گونه

مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق عامل این بیماری در بیمارستان ها و تعیین زیستگاههای طبیعی احتمالی این گونه قارچی ضروری به نظر می رسد. توالی نوکلئوتیدی ناحیه زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی جدایه های این گونه که در این پژوهش ایجاد شدند، منحصر به فرد می باشند و می توان از آنها جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی این گونه استفاده کرد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق موقعیت تاکسونومیک دو جنس رامیکلریدیوم و رینوکلادیلا را مشخص می کند، به این ترتیب که جنس رامیکلریدیوم در راسته کاپنودیالز و جنس رینوکلادیلا در راسته کتوتریالز قرار می گیرند. گونه رامیکلریدیوم مکنزی با در نظر گرفتن داده های مولکولی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی در جنس و راسته کتوتریالز تحت عنوان رینوکلادیلا مکنزی طبقه بندی می شود.

واقعا محدود به این منطقه می باشد یا اینکه در دیگر مناطق نیز وجود دارد ولی هنوز ناشناخته مانده است، جای بحث دارد. احتمال دارد این گونه قارچی از پراکنش وسیعی برخوردار باشد و بیماری ایجاد شده توسط این گونه ناشناخته باقی مانده باشد. اخیرا یک مورد بیماری آبسه مغزی منجر به مرگ از کشور هندوستان گزارش شده است که از بافت های مغزی گونه رینوکلادیلا مکنزی جداسازی شده است [۷]. با وجود اینکه به نظر می رسد این گونه بومی منطقه خاورمیانه می باشد، این گونه تاکنون از زیستگاههای طبیعی جداسازی نشده است با عنایت به نادر بودن این بیماری که تاکنون ۱۸ مورد از این بیماری گزارش شده است، به نظر می رسد که در منابع پزشکی تاکید کمتری بر روی این بیماری شده است. بنابراین توصیه می شود در منطقه خاورمیانه در بخش های درگیر با بیماری های سیستم اعصاب مرکزی و مغزی احتمال آلودگی با رینوکلادیلا مکنزی نیز کنترل شود. با عنایت به پیشرفت های اخیر در تکنیک های تشخیص مولکولی بیمارگرهای انسانی، ابداع روش

References

- 1- Haase G, Sonntag L, Melzer-Krick B, Hoog GS de. Phylogenetic inference by SSU gene analysis of members of the Herpotrichiellaceae, with special reference to human pathogenic species. *Stud in Mycol.* 1999; 43: 80–97.
- 2- Untereiner WA, Naveau FA. Molecular systematics of the Herpotrichiellaceae with an assessment of the phylogenetic positions of *Exophiala dermatitidis* and *Phialophora americana*. *Mycologia.* 1999, 91: 67–83.
- 3- Jacobson ES. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev.* 2000, 13: 708–717.
- 4- Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain. 2000, pp. 1124.
- 5- Arzanlou M, Groenewald JZ, Gams W, Braun U, Shin H-D, Crous PW. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of *Ramichloridium* and allied genera. *Stud in Mycol.* 2007, 58: 57–93.
- 6- Crous PW, Schoch CL, Hyde KD, Wood AR, Gueidan C, de Hoog GS, et al. Phylogenetic lineages in the Capnodiiales. *Stud Mycol.* 2005; 64: 17–47.
- 7- Badali H, Chander J, Bansal S, Aher A, Borkar SS, Meis JF, et al. First Autochthonous Case of *Rhinochlamydia mackenziei* Cerebral Abscess outside the Middle East. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 646–649.
- 8- Taj-Aldeen SJ, Almaslamani M, Alkhalaf A, Albozom I, Romanelli AM, Wickes BL, et al. Cerebral phaeohyphomycosis due to *Rhinochlamydia mackenziei* (formerly *Ramichloridium mackenziei*): a taxonomic update and review of the literature. *Medical Mycol.* 2010; 48 546–556.

- 9- Campbell CK, Al-Hedaithy SSA. Phaeohyphomycosis of the brain caused by *Ramichloridium mackenziei* sp. nov. in Middle Eastern countries. *J Med Vet Mycol.* 1993; 31: 325–332.
- 10- Kanj SS, Amr SS, Roberts GD. *Ramichloridium mackenziei* brain abscess: report of two cases and review of the literature. *Med Mycol.* 2001; 39: 97–102.
- 11- Kantarcioglu AS, Hoog GS de. Infections of the central nervous system by melanized fungi: a review of cases presented between 1999 and 2004. *Mycoses* 2004; 47: 4–13
- 12- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. Amplification and sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis N. Gelfand D. Sninsky J. White TC. eds. *PCR-Protocols and Applications – A Laboratory Manual*. New York: Academic Press, 1990; pp. 315–322.
- 13- Vilgalys R, Hester M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J Bacteriol.* 1990; 172: 4238–4246.

Taxonomic and phylogenetic position of *Rhinochlamydia mackenziei* (*Ramichloridium mackenziei*), causal agent of cerebral abscess in human

Arzanlou M, PhD

Plant Protection Department, Agriculture Faculty, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

E-mail: arzanlou@hotmail.com

ABSTRACT

Back ground and aim: Cerebral phaeohyphomycosis in humans is caused by fungal agent which belongs to black yeasts. The disease is apparently restricted to Middle East been reported from Saudi Arabia, occupied Palestine and Qatar. The disease has not been recorded from Iran yet or its existence has not been noticed. *Ramichloridium mackenziei* is responsible for this disease, which belongs to fungal order chaetothyriales. Members of this order are mainly opportunistic pathogens on humans and animals causing a wide range of infections such as chromoblastomycosis (cutaneous, subcutaneous) and cerebral phaeohyphomycosis. Species recognition and delineation in members of this order is based on morphological features of asexual stage (anamorph). This order encompasses several genera such as *Ramichloridium*, *Rhinochlamydia*, *Exophiala*, *Veronaea*, *Cladophialophora*. Some members of this order are morphologically similar to plant pathogenic or saprotrophic species and there is no clear-cut morphological differences among these genera. Accurate identification of human pathogenic species in both clinics and natural ecological niches will play important role in our understating on ecology of these fungi.

Materials and methods: In present study, 24 isolates belonging to 15 species from three genera viz., *Ramichloridium*, *Rhinochlamydia* and *Veronaea* were subjected to morphological and molecular examinations. Morphological features were evaluated on malt extract agar, using a slide culture technique. Phylogenetic relationship among isolates was inferred based on sequence data from two genomic regions of ribosomal DNA including partial sequences from ITS-rDNA and LSU-rDNA.

Results: Phylogeny inferred from DNA sequence data placed isolates in two groups. Clade one included *Rhinochlamydia* and *Veronaea* together with *Ramichloridium mackenziei* and *R. fasciculata*, *R. anceps* and *Rhinochlamydia basitona* which all belong to the order Chaetothyriales. The second clade included type species of genus *Ramichloridium* (*R. apiculatum*) together with other plant pathogenic *Ramichloridium* species which belong to the order Capnodiales. Putting together DNA sequence data, ecology and morphology, *Rhinochlamydia* is an appropriate genus to accommodate *Ramichloridium mackenziei*.

Conclusion: taxonomic and phylogenetic position of *Ramichloridium mackenziei* is ascertained in Chaetothyriales. Combination of DNA data set together with morphology and ecology is indispensable in identification of human pathogenic Chaetothyriales. Current work is good starting point towards studying importance and diversity of these fungi in Iran.

Keywords: *Ramichloridium mackenziei*, *Rhinochlamydia*, Brain abscess, Black yeast