

تعیین موقعیت تاکسونومیک و فیلوجنتیک گونه رینوکلادیبیلا مکنزی

(رامیکلریدیوم مکنزی)، عامل ایجاد آبسه مغزی در انسان

مهندی ارزانلو

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

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 مکنزی نامگذاری شده است که متعلق به راسته کتوتریالز می باشد. اغلب اعضای این راسته پاتوژن های فرست طلب بر روی انسان و حیوانات به شمار می روند که دامنه وسیعی از عفونت ها شامل کرومبلستومایکوزیس (عفونت های قارچی پوستی و زیر پوستی)، عفونت و آبسه مغزی را ایجاد می کنند. شناسایی اعضای این راسته بر پایه خصوصیات مورفوژئیک مرحله غیر جنسی استوار می باشد و جنس های رامیکلریدیوم، رینوکلادیلا، اگزوفی بالا و رونقا، کلادوفیالوفورا را شامل می شوند. برخی از جنس های واقع شده در این راسته از نظر مورفوژئیک 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 نثور مورفوژئیک 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 رونقا مورد بررسی مورفوژئیک و مولکولی واقع شدند. خصوصیات مورفوژئیک بر روی محیط کشت عصاره مالت آکار و با استفاده از تکنیک کشت لام بررسی شد. جهت مطالعه روابط فیلوجنتیکی بین جدایه ها، دو ناجیه ژنومی شامل بخشی از ناجیه (Internal ITS-tDNA) و بخشی از زیر واحد بزرگ ITSSpacer (ITS-tDNA) با استفاده از (LSU-tDNA) با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز تکثیر و محصولات واکنش پی سی آر تعیین توالی شدند و درخچه فیلوجنتیک ترسیم گردید.

یافته ها: درخچه فیلوجنتیک حاصل از زیر هم چین توالی های نوکلئوتیدی، جدایه های مورد بررسی را در دو خوش اصلی قرار می دهد. بر روی درخت فیلوجنتیک، خوش اول جدایه های رینوکلادیلا و رونقا به همراه گونه رامیکلریدیوم مکنزی و گونه های رامیکلریدیوم فسیکولاتا، رامیکلریدیوم آنپس و رامیکلریدیوم بیسی تونا را شامل می شود که در راسته کتوتریالز واقع می شوند. خوش 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 فیلوجنتیک، مورفوژئیک و گونه رامیکلریدیوم مکنزی در راسته کتوتریالز و جنس رینوکلادیلا طبقه بندی می شود.

نتیجه گیری: موقعیت تاکسونومیک و فیلوجنتیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی عامل ایجاد آبسه مغزی در انسان در جنس رینوکلادیلا و راسته کتوتریالز می باشد. استفاده از داده های مولکولی در کنار داده های مورفوژئیک 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 مکنزی؛ رینوکلادیلا؛ آبسه مغزی؛ مخمرهای سیاه

مقدمه

روی گیاهان ایجاد بیماری می کنند قابل تشخیص نیستند و حدود و ثغور مورفولوژیک این جنس ها از همدیگر مشخص نیستند. بطور کلی در این گروه از قارچ ها کنیدیها بر روی کنیدیوفورهای آزاد تولید می شوند. کنیدیوفورها از هیف های رویشی غیر متمایز و یا تا حدودی متمایز می باشند. سلولی کنیدیزا اغلب بصورت انتہایی بر روی کنیدیوفور تشکیل شده و به صورت سیمپودیال رشد کرده و تولید یک راکیس با ظاهری دندانه دار می نماید. برخی گروهها مانند گونه های جنس کلادوفیالوفورا تولید کلامیدوسپورهای توتوی شکل در محل بافت آلوده می نمایند. با این وجود تشخیص این جنس ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک از همدیگر براحتی امکان پذیر نیستند. بعنوان مثال خصوصیات مورفولوژیک جنس های رامیکلریدیوم، رینوکلادیلا و وروتنا با همدیگر همپوشانی دارند [۵].

گونه های جنس رامیکلریدیوم اغلب ساپروفیت بوده و یا بر روی گیاهان بیماریزا هستند در حالیکه گونه های جنس رینوکلادیلا اغلب بصورت پاتوژن های فرصت طلب بر روی انسان و حیوان یافت می شوند. علاوه بر این برخی از گونه های جنس رینوکلادیلا مانند گونه های جنس اگزوفی بالا دارای رشد مخمری نیز می باشند. گونه های جنس ورونا اغلب ساپروفیت بوده ولی برخی اعضای این جنس بعنوان عوامل بیماریزا بر روی انسان گزارش شده اند. برخی از گونه های جنس رامیکلریدیوم از نظر مورفولوژیک مشابه جنس کلادوسپوریوم می باشند. گونه های جنس کلادوسپوریوم اغلب ساپروفیت و یا همراه بافت های گیاهی می باشند، با این وجود برخی از گونه های این جنس باعث ایجاد آرژی بر روی انسان می شوند [۶، ۷].

با توجه به همپوشانی موجود بین خصوصیات مورفولوژیک رینوکلادیلا و رامیکلریدیوم، برخی از گونه های بیماریزا بر روی انسان در جنس رامیکلریدیوم طبقه بندی شده اند. گونه رامیکلریدیوم

مخمرهای سیاه به گروهی از قارچ های هیفو میست با میسلیوم رنگ اطلاق می شوند که برخی از اعضای این گروه از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان و دیگر حیوانات برخوردار بوده و بعنوان عوامل بیماریزای فرصت طلب به شمار می روند.

بیماری های ایجاد شده توسط اعضای این گروه شامل کروموبلاستومایکوزیس (عفونت های پوستی و زیر پوستی)، عفونت های مغزی تهدید کننده حیات می باشند. اغلب گونه های بیماریزا بر روی انسان در راسته کوتوریالز قرار گرفته اند [۱، ۲]. تولید رنگدانه ملانین و تحمل درجه حرارت های بالا دو فاکتور عمده در بیماریزای اعضای این راسته بر روی انسان به شمار می روند. ملانین یک رنگدانه قهوه ای تیره و یا سیاه رنگ با وزن مولکولی بالا می باشد که در نتیجه پلیمریزاسیون اکسیداتیو تر کیبات فنلی ایجاد می شود. رنگدانه ملانین از طریق محافظت سلولهای قارچی در برابر اکسیدان های قارچکش ها، ایجاد اختلال در پاسخ های دفاعی سلول میزان و کاهش حساسیت سلولهای ملانیزه در برابر ترکیبات قارچ کش عمل می کند. توانایی رشد در درجه حرارت های بالا یک فاکتور دیگر در بیماریزای اعضای این راسته به شمار می رود. برخی از اعضای این گروه در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد نیز رشد می کنند [۳، ۴].

اعضای این راسته از تنوع مورفولوژیک وسیعی برخوردار می باشند. تنها جنس تلئومورف شناخته شده در این راسته جنس کاپرونیا می باشد که تولید پریتیسیوم کاذب می کند [۱، ۲، ۵]. اغلب قارچ های واقع شده در این راسته قادر مرحله تلئومورف بوده و دارای چرخه تولید مثل غیر جنسی می باشند و جنس های رامیکلریدیوم، رینوکلادیلا، اگزوفیلا، ورونا، کلادوفیالوفورا و فونسکتا 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

مورفولوژیک به همراه دارد. توالی ژنهای کد کننده پروتئین و ژنهای کد کننده RNA ریبوزومی (rRNA) ناحیه ITS-rDNA، زیر واحد کوچک (LSU-rDNA) و زیر واحد بزرگ (SSU-rDNA) جهت تعیین سطح مختلف روابط خویشاوندی در بین قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۳، ۱۲، ۱۱، ۶، ۵، ۲]. اطلاعات حاصل از توالی نوکلئوتید‌ها در طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تشخیص مولکولی عوامل بیماریزا در کلینیک‌ها بصورت رایج مورد استفاده قرار می‌گیرند. لذا اهداف پژوهش حاضر شامل (۱) تعیین موقعیت تاکسونومیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی (۲) مطالعه روابط خویشاوندی بین جنس‌های بیماریزا بر روی انسان با دیگر گروههای قارچی ساپروفت و یا بیماریزا بر روی گیاهان بودند.

روش کار مورفولوژی

جدایه‌های قارچی: جدایه‌های قارچی مورد استفاده در این تحقیق همراه با منشاءٔ جغرافیایی و میزبان در جدول ۱ لیست شده است.

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

مکنزی بر روی انسان باعث ایجاد عفونت مغزی منجر به مرگ می‌شود. 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 شده‌اند. این بیماری اخیراً از کشور هندوستان نیز گزارش شده است [۱۰، ۹، ۸، ۷]. عامل بیماری این گونه بر روی محیط کشت تولید کلیه‌های کند رشد با ظاهری پنهان و به رنگ زیتونی تیره می‌کند. هیف‌ها به رنگ قهوه‌ای روش بوده و کنیدیوفورهای قارچ از هیف‌های رویشی غیر قابل تمایز بوده و یا تا حدودی تمایز می‌باشند. سلول کنیدی‌زا بصورت انتہایی و یا بین هیفی تشکیل می‌شوند، کنیدی‌های تک سلولی، قهوه‌ای روش، به اشکال استوانه‌ای تا بیضی شکل دیده می‌شوند.

بطور کلی تاکسونومی و شناسایی حدود و ثغور قارچ‌های آنامورفیک با مورفولوژی کم و بیش هم پوشان تلاشی فرا روی قارچ شناسان می‌باشد. شناسایی دقیق گونه‌های قارچی ساپروفتی از گونه‌های بیماری‌زا بر روی انسان و دیگر حیوانات از نظر کلینیکی از اهمیت بالایی برخودار می‌باشد. در ضمن در مطالعات اکولوژیکی جهت تعیین زیستگاههای طبیعی این قارچ‌ها، شناسایی دقیق ضروری می‌باشد [۵، ۹]. امروزه با بهره گیری از پیشرفت‌های ایجاد شده در زیست شناسی مولکولی، تعیین حدود و ثغور گروههای قارچی و دیگر موجودات زنده به راحتی DNA امکان پذیر می‌باشد. روش‌های مبتنی بر مشکلات موجود همراه با روش‌های کلاسیک شناسایی عوامل بیماریزا را مرتفع می‌کنند. بر عکس روش‌های کلاسیک، داده‌های DNA تحت تاثیر متغیرهای محیطی قرار نمی‌گیرند. مقایسه توالی‌های DNA بصورت رایج در مطالعه روابط خویشاوندی قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و در اغلب موارد نتایج مطمئن‌تری در مقایسه با خصوصیات

شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از 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 آئیدیوم بروماید زیر دستگاه ژل داک بررسی شدند. تعیین توالی: واکنش تعیین توالی نوکلئوتیدی قطعات BigDye تکثیر شده با استفاده از کیت تجاری (BigDye v. 3.1 terminator) مطابق دستورالعمل سازنده (ABI Persim 3700) کیت و با استفاده از دستگاه (ABI Persim 3700) انجام گردید.

فیلوجنی: 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 چنی (Mega 4) انجام جدایه ها با استفاده از نرم افزار گردید و الگوی هم ترازی چند گانه بررسی و درختنچه فیلوجنتیک 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 (LROR و LR) حدود ۵۷۰-۵۵۰ جفت باز و حدود ۹۰-۹۳ جفت باز به ترتیب تکثیر کردند. در این بررسی ناحیه ITS و زیر واحد بزرگ (LSU-rDNA) ۲۴

ساختارهای میکروسکوپی قارچ در سطح لامل، لامل از سطح بلوك آگار برداشته شد و لام میکروسکوپی در اسید لاکتیک تهیه و ساختارهای میکروسکوپی قارچ در حالت طبیعی و دست تخورده 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 کلی قارچ به اندازه کافی، استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری موبیو (MoBio laboratories, USA) مطابق دستورالعمل کارخانه انجام گردید. DNA استخراج شده در دمای منفی ۲۰ درجه نگهداری شد.

واکنش زنجیرهای پلی مراز:

جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغازگرهای ITS1(5TCCGTAGGTGAAACCTGCGG3) و ITS4 (5TCCTCCGCTTATTGATATGC3) مورد استفاده واقع شدند که این آغازگرها بخشی از SSU-rDNA (5.8S ITS1 و ITS2)، ناحیه ۵.8S و بخشی ناحیه ۵ LSU-rDNA (5TCCTGAGGGAAACTTCG3) از زیر واحد بزرگ (5ACCCGCTGAACTTAACG3) را با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مزار تکثیر می کنند [۱۲]. جهت تکثیر بخشی از زیر واحد بزرگ (5TCCGTAGGTGAAACCTGCGG3) آغازگرهای RoR(5ACCCGCTGAACTTAACG3) و LR5 (5TCCTGAGGGAAACTTCG3) مورد استفاده واقع شدند [۱۳]. مخلوط واکنش زنجیره ای پلی مراز شامل ۵٪ واحد آنزیم پلی مراز (Taq 1X PCR)، بافر واکنش (DNA polymerase 0.5 mM)، ۰.۵ میلی مول کلرید منیزیم (buffer)، ۰.۵ میلی مول از هر یک از dNTPs، ۵ پیکو مول از هر یک از آغازگرها و ۱۰-۱۵ نانو گرم از DNA بود که حجم نهایی مخلوط واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به مقدار ۲۵ میکرولیتر تنظیم

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

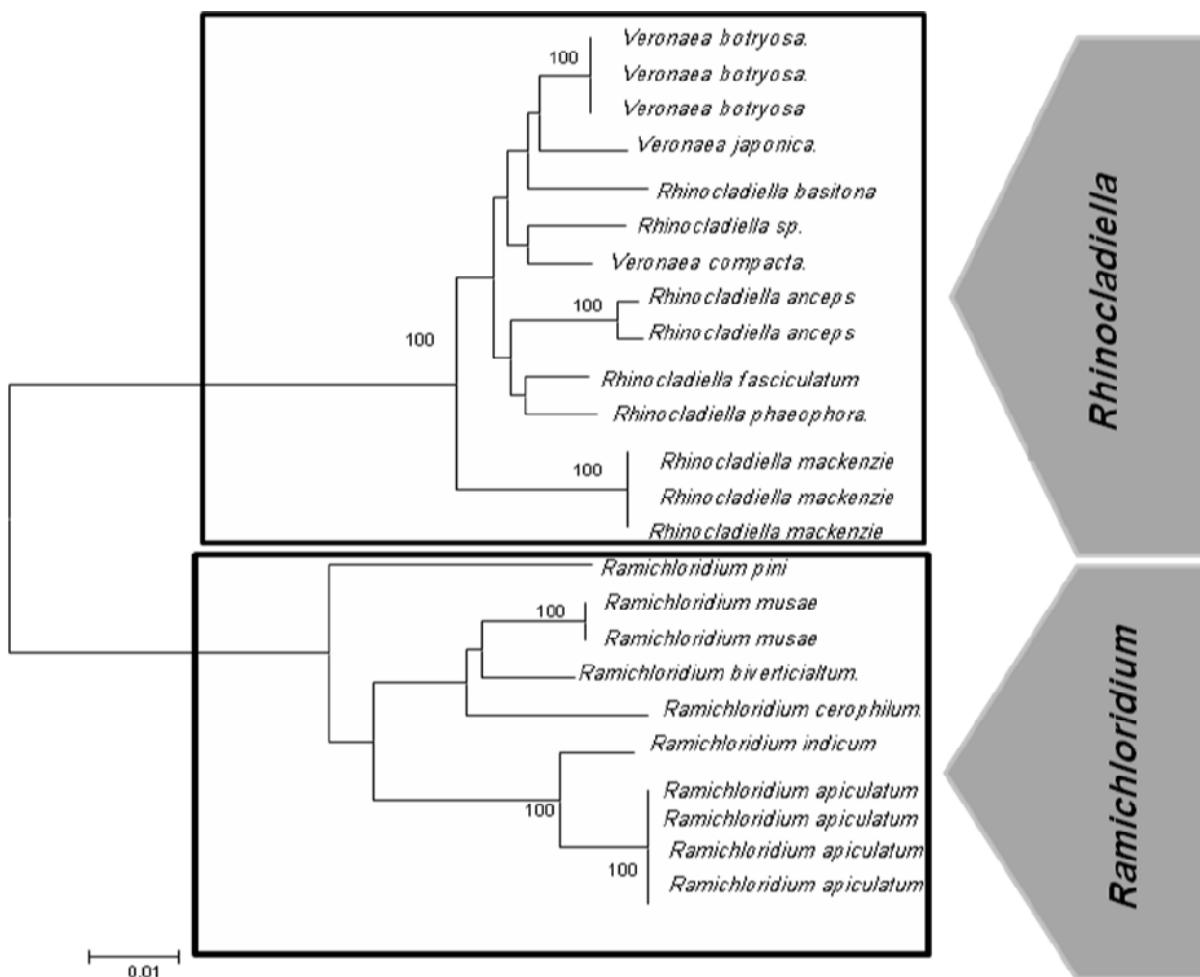
بر روی درخت فیلوژنیک خوش اول جدایه های رینوکلادیلا و وروئتا به همراه گونه رامیکلریدیوم مکنزی و گونه های رامیکلریدیوم فسی کولاتا.

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

درختچه فیلوژنیک 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 خوش اصلی قرار داد. با توجه به

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

گونه	میزان	منشاء جغرافیایی
Ramichloridium apiculatum	خاک	آمریکا
Ramichloridium apiculatum	<i>Cucumis sativus</i>	افریقای جنوبی
Ramichloridium apiculatum	Aloe sp.	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
Rhinocladiella anceps	<i>Fagus sylvatica</i>	فرانسه
Rhinocladiella basitona	انسان	ژاپن
Rhinocladiella fasciculata	چوب در حال پوسیدن	هندوستان
Rhinocladiella phaeophora	خاک	کلمبیا
Rhinocladiella sp.	عسل	فرانسه
Rhinocladiella mackenziei	انسان	فلسطین اشغالی
Rhinocladiella mackenziei	انسان	فلسطین اشغالی
Rhinocladiella mackenziei	انسان	امارات متحده عربی
Veronaea botryosa	پن 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 فیلوژنیک با استفاده از نرم افزار Maga 4 ترسیم شده است

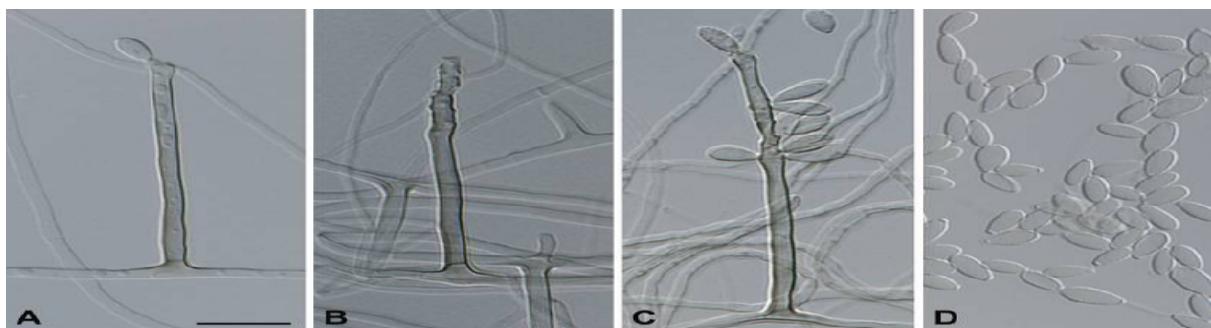
مورفولوژیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی با گونه تیپ جنس رینوکلادیلا (Rinocladiella Atroviridis)، جنس رینوکلادیلا یک جنس مناسب برای گونه رامیکلریدیوم مکنزی و دیگر گونه های رامیکلریدیوم واقع شده در راسته کتوتربالزا می باشد. گونه ورونتا بوتریووزا نیز به عنوان عامل عفونت پوستی و زیر پوستی گزارش شده ولی خصوصیات مورفولوژیک این جنس از جنس رینوکلادیلا متفاوت است. جنس ورونتا 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

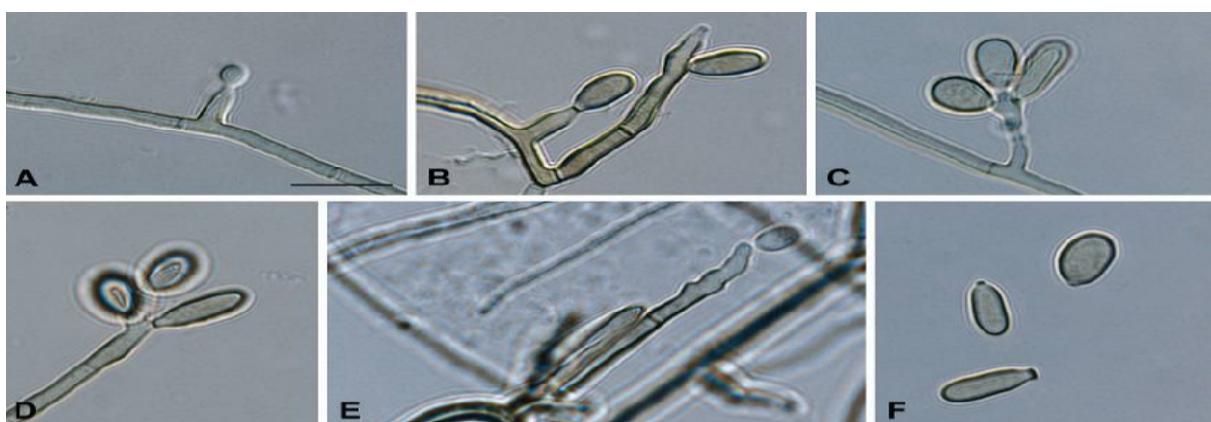
رامیکلریدیوم آنسپس و رامیکلریدیوم بیسی تونا را شامل می شد که در راسته کتوتربالز واقع می شوند. خوش دوم گونه تیپ جنس رامیکلریدیوم (رامیکلریدیوم اپی کولاتوم) به همراه دیگر گونه های رامیکلریدیوم که بر روی گیاهان ایجاد بیماری می کنند را شامل می شد که در راسته کاپنودیالز قرار می گیرند. از نظر اکولوژیکی اعضای این دو راسته با همدیگر متفاوت می باشند، اغلب گروههای قارچی واقع در راسته کتوتربالز 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 نمی رسد. اعضای هر دو جنس تولید کنیدی های تک سلولی می کنند که بر این اساس نیز نمی توان این دو جنس را از همدیگر تشخیص داد. با این وجود

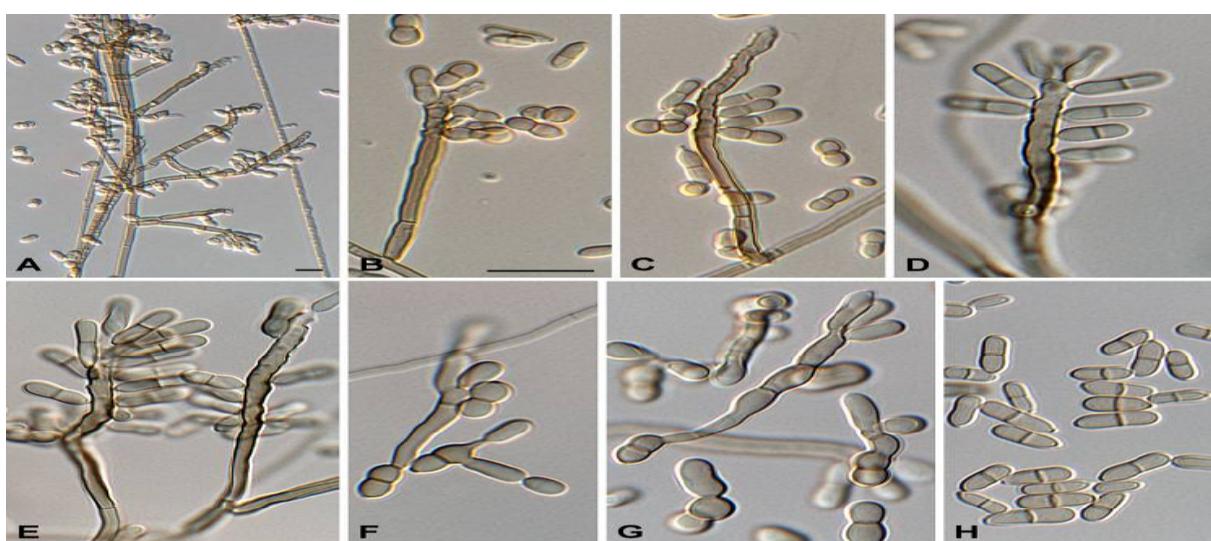
(اشکال ۲ و ۳). در جنس *Ramichloridium* کنیدیفورهای از هیف های رویشی متمایز می باشند (شکل ۲) ولی در *Rinocladiella* کنیدیوفورها از هیف های رویشی به سختی متمایز می شوند [۳].



شکل ۲. مشخصات میکروسکوپی گونه *Ramichloridium* ابی کولاتوم. ای، بی، سی: کنیدیوفور و سلول های کنیدی ز؛ دی: کنیدی



شکل ۳. مشخصات میکروسکوپی گونه *Rinocladiella* مکنزی. ای، بی، سی، دی و ای: کنیدیوفور و سلول های کنیدی ز؛ اف: کنیدی



شکل ۴: مشخصات میکروسکوپی گونه *Wronetia botryosa*. ای، بی، سی، دی و ای: کنیدیوفور و سلول های کنیدی ز؛ اف و جی: کنیدی های در حال جوانه زنی؛ اج: کنیدی

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

با انکا بر خصوصیات اکولوژیک می‌توان تا حدودی اعضای این دو راسته را از همدیگر تشخیص داد، ولی با این وجود اغلب گروههای قارچی واقع شده در راسته کتوتریالز از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار هستند برخی گروهها زندگی ساپروفیتی دارند. این وضعیت در مورد راسته کاپنودیالز هم صدق می‌کند، اغلب اعضای این راسته با میزبان‌های گیاهی همراه بوده و یا زندگی ساپروفیتی دارند ولی برخی از پتانسیل ایجاد بیماری بر روی انسان برخوردار هستند.

داده‌های مبتنی بر DNA مشکلات همراه با ویژگیهای مورفولوژیک را مرتفع می‌سازند. زیرا فنوتیپ هر موجود زنده محصول بیان ژنوتیپ آن بوده و با استفاده از اطلاعات DNA در اغلب موارد می‌توان تغییرات فنتیکی موجودات زنده را بررسی کرد. داده‌های مولکولی ابزار مناسبی برای درک روابط فیلوژنتیکی بین موجودات زنده به شمار می‌روند [۴]. چنانکه نتایج این بررسی نشان داد گونه رینوکلادیلا مکنزی به راحتی از دیگر گونه‌های رامیکلریدیوم بر اساس داده‌های توالی نوکلئوتیدی DNA ریبوزومی شناسایی گردید و موقعیت فیلوژنتیک آن بررسی گردید. با ترکیب داده‌های DNA با خصوصیات مورفولوژیک و اکولوژیک و دیگر خصوصیات افتراقی بین گروههای قارچی می‌توان نتایج مطمئن‌تری کسب کرد. به نظر می‌رسد که در آینده روش‌های ترکیبی در شناسایی و رده‌بندی قارچ‌ها بیشتر مورد استفاده شوند.

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

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

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که موقعیت تاکسونومیک و فیلوژنتیک گونه رامیکلریدیوم مکنزی راسته کتوتریالز می‌باشد. در این راسته جنس‌های مختلفی واقع شده اند که مرحله جنسی آنها هنوز کشف نشده اند. تنها جنس تلئومورف شناخته شده در این راسته جنس کاپرونیا می‌باشد [۵، ۶، ۷]. لذا گروه‌بندی این گروه از قارچ‌ها تاکنون بر اساس خصوصیات مرحله غیر جنسی استوار بوده است. بطور کلی رده‌بندی گروههای قارچی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک مرحله غیر جنسی منجر به نتیجه‌گیری‌های غیر واقعی و گروه‌بندی‌های غیر طبیعی می‌شود. این نتیجه‌گیری‌های غیر واقعی می‌تواند به این خاطر باشد که خصوصیات مورفولوژیک ممکن است از جد مشترک منشاء نگرفته باشند و در نتیجه نیازهای اکولوژیک و تغذیه‌ای ایجاد شود که اصطلاحاً تکامل همگرا نامیده می‌شود. عنوان مثال جنس رامیکلریدیوم و رینوکلادیلا از نظر مورفولوژیک به سختی از یکدیگر تمایز هستند. در حالیکه نتیجه پژوهش حاضر نشان می‌دهد که این دو جنس در دو راسته مجزا قرار گرفته اند. بنابراین مبنای قرار دادن خصوصیات مورفولوژیک به تنها جهت شناسایی این گروه از قارچ‌ها توصیه نمی‌شود. جدایه‌های گونه رینوکلادیلا مکنزی به صورت یک گروه مجزا در راسته کتوتریالز قرار می‌گیرند ولی از آنجاییکه معرفی جنس جدید برای قارچ‌های آنامورف با مورفولوژی کم و بیش مشابه که در داخل یک راسته قارچی توصیه نمی‌شود، گونه مذکور در جنس رینوکلادیلا که در مقایسه با دیگر جنس‌ها

مولکولی برای تشخیص سریع و دقیق عامل این بیماری در بیمارستان‌ها و تعیین زیستگاه‌های طبیعی احتمالی این گونه قارچی ضروری به نظر می‌رسد. توالی نوکلئوتیدی ناحیه زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی جدایه‌های این گونه که در این پژوهش ایجاد شدند، منحصر به فرد می‌باشند و می‌توان از آنها جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی این گونه استفاده کرد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق موقعیت تاکسونومیک دو جنس رامیکلریدیوم و رینوکلادیبیلا را مشخص می‌کند، به این ترتیب که جنس رامیکلریدیوم در راسته کاپنودیالز و جنس رینوکلادیبیلا در راسته کتوتریالز قرار می‌گیرند. گونه رامیکلریدیوم مکنزی می‌باشد. نظر گرفتن داده‌های مولکولی، مورفولوژیکی و اکولوژیکی در جنس و راسته کتوتریالز تحت عنوان رینوکلادیبیلا مکنزی طبقه‌بندی می‌شود.

واقع محدود به این منطقه می‌باشد یا اینکه در دیگر مناطق نیز وجود دارد ولی هنوز ناشناخته مانده است، جای بحث دارد. احتمال دارد این گونه قارچی از پراکنش وسیعی برخودار باشد و بیماری ایجاد شده توسط این گونه ناشناخته باقی مانده باشد. اخیراً یک مورد بیماری آبسه مغزی منجر به مرگ از کشور هندوستان گزارش شده است که از بافت‌های مغزی گونه رینوکلادیبیلا مکنزی جداسازی شده است [۷]. با وجود اینکه به نظر می‌رسد این گونه بومی منطقه خاورمیانه می‌باشد، 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 می‌رسد که در منابع پژوهشی تأکید کمتری بر روی این بیماری شده است. بنابراین توصیه می‌شود در منطقه خاورمیانه در بخش‌های درگیر با بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی و مغزی احتمال آسودگی با رینوکلادیبیلا مکنزی نیز کنترل شود.

با عنایت به پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های 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 Capnodiales. 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 Rhinocladiella mackenziei Cerebral Abscess outside the Middle East. J Clin Microbiol. 2010; 48: 646–649.
- 8- Taj-Aldeen SJ, Almaslamani M, Alkhalf A, Albozom I, Romanelli AM, Wickes BL, et al. Cerebral phaeohyphomycosis due to Rhinocladiella 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 *Rinocladiella mackenziei* (*Ramichloridium mackenziei*), causal agent of cerebral abscission 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*, *Rhinocladiella*, *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*, *Rhinocladiella* 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 *Rhinocladiella* and *Veronaea* together with *Ramichloridium mackenziei* and *R. fasiculata*, *R. anceps* and *Rhinocladiella basitona* which all belong to the order Chaetothyriales. The second clade included type species of genus *Ramichloridium* (*R. apiculatum*) together with other plant pathogenic *Ramicholridium* species which belong to the order Capnodiales. Putting together DNA sequence data, ecology and morphology, *Rhinocladiella* 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*, *Rhinocladiella*, Brain abscess, Black yeast