

الله
البر
الرحمن
الرحيم



پایان نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان:

شناسایی آلترناریای های موجود در هوای مناطق تهران با
استفاده از ویژگیهای مورفولوژیک و تکنیک ملکولی RFLP

نگارش

نرگس اصلانی

استاد راهنما

دکتر معصومه شمس قهفرخی

استاد مشاور

دکتر مهدی رزاقی ابیانه


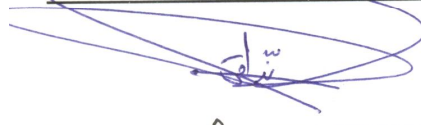

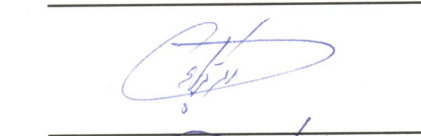
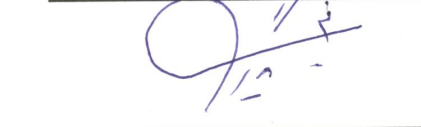
زمستان ۱۳۹۱



تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از
پایان نامه کارشناسی ارشد

خانم نرگس اصلانی رشته قارچ شناسی پزشکی پایان نامه کارشناسی ارشد خود را با عنوان
« شناسایی الترناریای های موجود در هوای مناطق تهران با استفاده از ویژگیهای مورفولوژیک و
تکنیک ملکولی RFLP » در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۱۷ ارائه کردند.
بدینوسیله اعضای هیات داوران نسخه نهایی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوا تایید کرده و پذیرش آنرا برای
تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

	دکتر معصومه شمس	(استاد راهنما)
	دکتر مهدی رزاقی	(استاد مشاور)
	دکتر شهلا رودبار محمدی	(استاد ناظر)
	دکتر پروانه کردبچه	(استاد ناظر)
	دکتر محمد حسین یادگاری	(نماینده تحصیلات تکمیلی)

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به دفتر «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته **قارچ شناسی پزشکی** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکده **علوم پزشکی** دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی **سرکار خانم دکتر معصومه شمس قهفرخی** و مشاوره **آقای دکتر مهدی رزاقی ابیانه** از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت بیه دانشگاه تربیت مدرس، تادیبه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶: اینجانب **نرگس اصلانی** دانشجوی رشته **قارچ شناسی پزشکی** مقطع **کارشناسی ارشد** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **نرگس اصلانی**

تاریخ و امضاء: **۹۱، ۱۱، ۱۳**

آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجوی مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

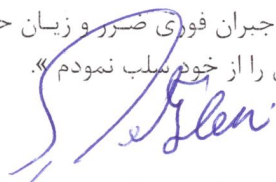
تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب و یا نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آیین‌نامه‌های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب نرگس اصلانی دانشجوی رشته قارچ‌شناسی پزشکی ورودی سال تحصیلی ۱۳۸۸ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم پزشکی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش‌های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته‌های علمی مستخرج از پایان‌نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آیین نامه فوق‌الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می‌دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هرگونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله براساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هرگونه اعتراض را از خود سلب نمودم.»


۹۱، ۱۱، ۸۷

امضا

تاریخ

«بناشگر از الطاف لہی»

تقدم:

بہ مادر م کہ ایمان بخدا تہ کال بہ او و تلاش را بہ من آموخت،
بہ پدر م کہ بکلید بانی و سخنکشہ و راوبرای ہم و اساخت،
بہر مہر بازم کہ و ارہ یار و پشتیبان من بودہ و در طول انجام این پایان نامہ ساعدتہای فخری خوش را از من دریغ نکرد،
و بہر تہا ذی کہ کی انہہ تہرین شوق ہای من در کار ہائیکہ و ام بودہ اند،
و بہر تہا کماہا ذی کہ طریزہ م قلب و دستشان دارم.

سپاسگزاری:

سپاس یزدان پاک را که توفیق اتمام این پایان نامه را نصیبم کرد، جا دارد از عزیزانی که در این کار مرا یاری کردند کمال تشکر و قدر دانی را داشته باشم:

سرکار خانم دکتر معصومه شمس قهفرخی که در سمت استاد راهنمای اینجانب، دلسوزانه با راهنمایی‌ها و کمک‌های بسیار خویش مرا در انجام هرچه بهتر این کار یاری کردند.

جناب آقای دکتر مهدی رزاقی ابیانه (دانشیار پژوهش بخش قارچ شناسی انستیتو پاستور ایران) در سمت استاد مشاور که هم فکری و راهنمایی‌های ایشان در به ثمر رسیدن مطلوب تر این اثر بسیار موثر بود.

سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی و جناب آقای دکتر محمد حسین یادگاری (مدیر محترم گروه قارچ شناسی پزشکی دانشگاه تربیت مدرس) که همواره برای ارتقاء و پیشرفت گروه و دانشجویان تلاش کرده‌اند.

سرکار خانم رازقی (کارشناس محترم گروه قارچ شناسی)، جناب آقای کرون‌دیان (کارشناس محترم گروه بیوتکنولوژی) به علت همکاری‌های صمیمانه ایشان با این جانب.

دوستان خوبم آقای حسین رحیمی، و خانم‌ها، حسینی، صلاحی که در طول مدت تحصیل در کنا یکدیگر اوقات خوبی را سپری کردیم.

تشکر ویژه از دوستان بسیار مهربانم سرکار خانم‌ها ساناز آقایی، نسرین علی پور، الهام کردستانی و کاوه پیکاری.

در انتها تشکر و قدردانی از مادر، همیشه چشم به راهم پدر، صبورم برادر، عزیزم وهمسره مهربانم که همیشه مشوق و حامی من بودند و خواهند بود.

چکیده:

از آنجائیکه شناسایی گونه های آلترناریا بر اساس ویژگیهای مورفولوژیک به دلیل درجات بالایی از تشابهات مورفولوژیک در گونه های مرتبط، موجب اشکالاتی در شناسایی آنها می گردد بنابراین استفاده از روشهای مولکولی مانند RFLP بعنوان یک روش بسیار حساس و تجدید پذیر که دارای قابلیت تشخیص پلی مورفیسم های مختلف بین نواحی ژنومی می باشد حائز اهمیت است. در این مطالعه، ۶۴۵۵ جدایه قارچی با استفاده از روش پلیت درب باز از هوای استان تهران جدا شد که ۸۲۶ جدایه قارچی که مشخصات جنس آلترناریا را داشتند، مورد مطالعه مورفولوژیک و مولکولی قرار گرفتند. بررسی مورفولوژیکی جدایه ها بر روی محیط کشت سیب زمینی-هویج-آگار و تحت شرایط کنترل شده انجام گرفت. با استفاده از تلفیق روش مورفولوژیک و تعیین توالی نواحی ITS1/4، ۸۲۶ ایزوله آلترناریا جداسازی شده، در ۵ گونه قرار گرفتند که شامل آلترناریا سولانی (۱۵.۳٪)، آلترناریا تنوسیما (۱۳.۶٪)، آلترناریا برسیکا (۱۰.۲٪)، آلترناریا آلترناتا (۲۸.۸٪) و آلترناریا پوری (۳۲.۲٪) می باشند جهت بررسی و مقایسه الگوی PCR-RFLP هر یک از گونه های مزبور، ناحیه تکثیر شده ITS1/4 که برای تمام گونه های آلترناریا یک قطعه ۵۷۰ bp بود تحت تأثیر آنزیم های برش دهنده $\square\square\square$ *Hind*, *Mse*, *Rsa*, *Eco*1, *Taq* قرار گرفت. الگوی قطعات حاصل بدنبال تأثیر آنزیم برش دهنده \square *Taq*، دو قطعه ۲۸۰ و ۸۰ جفت بازی، برای آنزیم *Eco*1 یک قطعه ۳۰۰ جفت بازی، برای آنزیم *Rsa* دو قطعه ۲۸۰ و ۱۵۰ جفت بازی، برای آنزیم *Mse* سه قطعه ۳۵۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ جفت بازی و برای آنزیم $\square\square\square$ *Hind* دو قطعه ۳۵۰ و ۲۰۰ جفت بازی بود. نتایج بدست آمده نشان داد که الگوی حاصل از نواحی برش داده شده توسط آنزیم های مذکور بر روی ناحیه ITS1/4 در بین ۵ گونه مورد بررسی اختلاف چندانی با یکدیگر نداشتند. با توجه به نقش بارز آلترناریاها در القاء پاسخ های آلرژیک و خسارات اقتصادی ناشی از آلودگی محصولات کشاورزی شناسایی این جنس در سطح گونه از نظر پراکندگی و میزان شیوع گونه های غالب حائز اهمیت است لذا راه اندازی یک سیستم تشخیصی مولکولی بر اساس تعیین توالی نواحی ژنومی مختلف و استفاده از تکنیک RFLP اطلاعات جامعی را در تعیین الگوی جمعیتی آلترناریاها در اختیار قرار می دهد که می تواند در جلوگیری و کنترل عفونت های ناشی از آلترناریاها بویژه القاء پاسخ های آلرژیک در افراد راهگشا باشد.

واژگان کلیدی: گونه های آلترناریا، شناسایی مورفولوژیک، تعیین توالی، تکنیک مولکولی RFLP

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول: مقدمه
۲	۱-۱- کلیات
۴	۲-۱- جنس آلترناریا
۸	۳-۱- بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی برخی از گونه‌های آلترناریا
۸	۱-۳-۱- آلترناریا آلترناریا
۹	۲-۳-۱- آلترناریا آرپورسنس
۹	۳-۳-۱- آلترناریا برسیکا
۱۰	۴-۳-۱- آلترناریا برسیسیکولا
۱۰	۵-۳-۱- آلترناریا کلایمیدوسپورا
۱۱	۶-۳-۱- آلترناریا سینراریا
۱۱	۷-۳-۱- آلترناریا دایوسی
۱۲	۸-۳-۱- آلترناریا دسترونس
۱۲	۹-۳-۱- آلترناریا دیانتکولای
۱۲	۱۰-۳-۱- آلترناریا دوموسا
۱۲	۱۱-۳-۱- آلترناریا هلیانی
۱۳	۱۲-۳-۱- آلترناریا اینفکتوریا
۱۳	۱۳-۳-۱- آلترناریا ژاپونیکا
۱۴	۱۴-۳-۱- آلترناریا ماکروسپورا
۱۴	۱۵-۳-۱- آلترناریا موچاکا
۱۴	۱۶-۳-۱- آلترناریا نوبیلی
۱۴	۱۷-۳-۱- آلترناریا پتروسلینی
۱۵	۱۸-۳-۱- آلترناریا پورری
۱۵	۱۹-۳-۱- آلترناریا رادیسینا

- ۱۵-۳-۲۰- آلترناریا تنئوسیما.....
- ۱۶-۳-۲۱- آلترناریا تومیتوفیلا.....
- ۱۶-۳-۲۲- آلترناریا تریتیسینا.....
- ۱۶-۳-۲۳- آلترناریا تورکیسافریا.....
- ۱۷-۳-۲۴- آلترناریا زینیه.....
- ۱۷-۴-۱- بیماریزایی گونه‌های آلترناریا.....
- ۱۸-۴-۱- آسم و آلرژی.....
- ۱۹-۴-۲- عفونت پوستی.....
- ۱۹-۴-۳- سینوزیت قارچی آلرژیک.....
- ۲۰-۴-۴- فتوهایفومایکوزیس.....
- ۲۰-۴-۵- عفونت‌های فرصت طلب.....
- ۲۱-۵-۱- متابولیت‌های ثانویه و مایکوتوکسین‌های تولید شده به وسیله آلترناریاها.....
- ۲۳-۶-۱- بکارگیری تکنیک‌های مولکولی در شناسایی و تفریق گونه‌های آلترناریا.....
- ۲۵-۶-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی مرارز.....
- ۲۹-۶-۲- تکنیک PCR-RFLP.....
- ۳۲-۶-۳- تکنیک PCR-RAPD.....
- ۳۳-۶-۴- تکنیک PCR-AFLP.....
- ۳۴-۶-۵- تکنیک تعیین توالی نوکلئوتیدی.....

۳۷- فصل دوم: مروری بر مطالعات گذشته.....

۴۵- فصل سوم: مواد و روش‌ها.....

- ۴۶-۱-۳- نمونه برداری و جداسازی عوامل قارچی موجود در هوای مناطق ۲۲ گانه تهران.....
- ۴۷-۲-۳- شناسایی و تفریق ایزوله‌های آلترناریا جداسازی شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک.....
- ۴۷-۲-۳-۱- بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی.....

- ۴۷-۲-۲-۳ بررسی ویژگیهای میکروسکوپی
- ۴۷-۳-۳ شناسایی و تفریق ایزوله‌های آلترناریا جداسازی شده بر اساس تکنیک‌های ملکولی
- ۴۷-۱-۳-۳ استخراج DNA
- ۴۷-۱-۱-۳-۳ کشت و جداسازی میسلیوم‌های قارچی
- ۴۸-۲-۱-۳-۳ استخراج DNA از میسلیوم‌های قارچی با استفاده از بافر لیز کننده
- ۴۹-۳-۱-۳-۳ طرز تهیه ی اتیلن دی آمین تتر-استیک اسید (EDTA)
- ۴۹-۴-۱-۳-۳ طرز تهیه ی Tris- HCL ۱ مولار
- ۴۹-۵-۱-۳-۳ تهیه ی فنل بافری اشباع شده با Tris-HCL
- ۵۴-۶-۱-۳-۳ بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده
- ۵۴-۱-۶-۱-۳-۳ تعیین میزان کمی DNA
- ۵۵-۲-۶-۱-۳-۳ بررسی کیفی حضور DNA
- ۵۶-۲-۳-۳ مراحل انجام PCR
- ۵۹-۱-۲-۳-۳ انجام مراحل تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS1/4 حاصل از PCR
- ۵۹-۳-۳-۳ مراحل انجام تکنیک PCR-RFLP
- ۵۹-۱-۳-۳-۳ استفاده از آنزیم‌های برش دهنده مناسب جهت انجام RFLP
- ۵۹-۲-۳-۳-۳ هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برش دهنده Taq1, Hind3
- ۶۰-..... Rsa1 و Ecor1 , Mse1

۶۲ فصل چهارم: نتایج و یافته‌ها

- ۶۴-۱-۴ نتایج حاصل از شناسایی مورفولوژیک و پراکندگی عوامل قارچی جداسازی شده از هوای مناطق تهران
- ۶۳-۲-۴ نتایج حاصل از شناسایی و پراکندگی ایزوله‌های آلترناریا جداسازی شده از هوای مناطق
- ۶۵-۲۲ گانه تهران بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک
- ۶۴-۳-۴ نتایج حاصل از شناسایی مولکولی گونه‌های آلترناریا جداسازی شده از نمونه‌های هوای مناطق ۲۲ گانه تهران
- ۶۹-.....

۶۹.....	نتایج استخراج DNA	۱-۳-۴
۷۰.....	نتایج حاصل از PCR ناحیه ITS1 و ITS4 گونه‌های آلترناریا.....	۲-۳-۴
۷۱.....	نتایج حاصل از تعیین توالی نواحی ITS1 و ITS4 گونه‌های آلترناریا.....	۳-۳-۴
۷۳.....	نتایج حاصل از انجام RFLP جهت تفریق گونه‌های آلترناریا.....	۴-۳-۴
۷۵.....	نتایج حاصل از قطعات ایجاد شده توسط آنزیم برش دهنده EcoR1.....	۱-۴-۳-۴
۷۵.....	نتایج حاصل از قطعات ایجاد شده توسط آنزیم برش دهنده Mse1.....	۲-۴-۳-۴
۷۶.....	نتایج حاصل از قطعات ایجاد شده توسط آنزیم برش دهنده Hind 3.....	۳-۴-۳-۴
۷۷.....	نتایج حاصل از قطعات ایجاد شده توسط آنزیم برش دهنده Rsa1.....	۴-۴-۳-۴
۷۷.....	نتایج حاصل از قطعات ایجاد شده توسط آنزیم برش دهنده Taq 1.....	۵-۴-۴-۴
۸۰.....	فصل پنجم: بحث، نتیجه‌گیری و پیشنهادها	
۸۱.....	بحث و نتیجه‌گیری.....	۱-۵
۸۹.....	پیشنهادها.....	۲-۵
۹۰.....	فهرست منابع و مآخذ.....	
۱۰۲.....	چکیده انگلیسی.....	

فهرست جداول

صفحه	عنوان
۵۷	جدول (۱-۳) اجزاء و مقادیر ترکیبات واکنش PCR.....
۵۸	جدول (۲-۳) پروفایل حرارتی سیکل PCR.....
۶۴	جدول (۱-۴) درصد فراوانی شایعترین عوامل قارچی جدا شده از هوای تهران بر جایگاه‌های مورد بررسی.....
۶۸	جدول (۲-۴) ویژگی مورفولوژیک گونه‌های آلترناریا.....
۶۸	جدول (۳-۴) درصد فراوانی گونه‌های آلترناریا جدا شده از هوای تهران.....
۷۴	جدول (۴-۴) آنزیم‌های برش دهنده توالی ناحیه ITS 1/4.....
۷۹	جدول (۵-۴) نتایج حاصل از انجام RFLP بر روی گونه‌های آلترناریا.....

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۰	شکل (۱-۱) ساختمان شیمیایی دستروکسین.....
۶۵	شکل (۱-۴) منظره ماکروسکوپی (الف) و منظره میکروسکوپی آلترناریا تنئوسیما (ب) در محیط سبب زمینی-هویج-آگار.....
۶۵	شکل (۲-۴) منظره ماکروسکوپی (الف) و منظره میکروسکوپی آلترناریا سولانی (ب) در محیط سبب زمینی-هویج-آگار.....
۶۶	شکل (۳-۴) منظره ماکروسکوپی (الف) و منظره میکروسکوپی آلترناریا برسیکا (ب) در محیط سبب زمینی-هویج-آگار.....
۶۶	شکل (۴-۴) منظره ماکروسکوپی (الف) و منظره میکروسکوپی آلترناریا آلترناتا (ب) در محیط سبب زمینی-هویج-آگار.....
۶۷	شکل (۵-۴) منظره ماکروسکوپی (الف) و میکروسکوپی آلترناریا پوری (ب) در محیط سبب زمینی-هویج-آگار.....
۷۰	شکل (۶-۴) ستون ۱ الی ۱۲، DNA استخراج شده از گونه‌های آلترناریا، M: مارکر ملکولی ۱۰۰ جفت باز.....
۷۰	شکل (۷-۴) ستون‌های ۱ الی ۸ مربوط به PCR گونه‌های آلترناریا با استفاده از پرایمرهای ITS1، ITS4 ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز.....
۷۱	شکل (۸-۴) نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه ITS1/ITS4 آلترناریا تنئوسیما.....
۷۲	شکل (۹-۴) نتیجه بلاست حاصل از توالی ناحیه ITS1/4 آلترناریا تنئوسیما در NCBI.....
۷۲	شکل (۱۰-۴) توالی ناحیه ITS1/4 در آلترناریا تنئوسیما.....
۷۳	شکل (۱۱-۴) دندوگرام حاصل از بررسی ارتباط فیلوژنیک گونه‌های آلترناریا بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی نواحی ITS1/4.....
۷۴	شکل (۱۲-۴) آنزیم‌های برش دهنده توالی ناحیه ITS 1/4.....

شکل (۴-۱۳) الگوی قطعات حاصل از اثر آنزیم EcoR1 بر ناحیه ITS1/4 متعلق به گونه‌های آلترناریا مورد بررسی می‌باشد. ستون‌های ۱ الی ۵ به ترتیب آلترناریا آلترناتا، آلترناریا برسیکا، آلترناریا سولانی، آلترناریا تنئوسیما، آلترناریا پوری و ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز می‌باشد..... ۷۵

شکل (۴-۱۴) الگوی قطعات حاصل از اثر آنزیم Mse1 بر ناحیه ITS1/4 متعلق به گونه‌های آلترناریا مورد بررسی می‌باشد. ستون‌های ۱ الی ۵ به ترتیب آلترناریا آلترناتا، آلترناریا برسیکا آلترناریا سولانی، آلترناریا تنئوسیما، آلترناریا پوری و ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز می‌باشد..... ۷۶

شکل (۴-۱۵) الگوی قطعات حاصل از اثر آنزیم Hind3 بر ناحیه ITS1/4 متعلق به گونه‌های آلترناریا مورد بررسی می‌باشد. ستون‌های ۱ الی ۵ به ترتیب آلترناریا آلترناتا، آلترناریا برسیکا آلترناریا سولانی، آلترناریا تنئوسیما، آلترناریا پوری و ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز می‌باشد..... ۷۶

شکل (۴-۱۶) الگوی قطعات حاصل از اثر آنزیم Rsa1 بر ناحیه ITS1/4 متعلق به گونه‌های آلترناریا مورد بررسی می‌باشد. ستون‌های ۱ الی ۵ به ترتیب آلترناریا آلترناتا، آلترناریا برسیکا آلترناریا سولانی، آلترناریا تنئوسیما، آلترناریا پوری و ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز می‌باشد..... ۷۷

شکل (۴-۱۷) الگوی قطعات حاصل از اثر آنزیم Taq 1 بر ناحیه ITS1/4 متعلق به گونه‌های آلترناریا مورد بررسی می‌باشد. ستون‌های ۱ الی ۵ به ترتیب آلترناریا آلترناتا، آلترناریا برسیکا آلترناریا سولانی، آلترناریا تنئوسیما، آلترناریا پوری و ستون M، مارکر DNA ۱۰۰ جفت باز می‌باشد..... ۷۸

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

هوا که ضروری ترین نیاز بشر است واجد میکروارگانیسم های مختلفی می باشد که قادر به ایجاد بیماری های عفونی و آلرژیک در انسان می باشند [۱]. اسپورهای قارچی نیز جزئی از این میکروارگانیسم ها هستند [۲]. در هر دم که هوا وارد شش های ما می شود قارچ های موجود در آن نیز می توانند وارد بدن شوند و از آنجائیکه به یک محیط مغذی دست می یابند میزان رشد آنها ۱۰۰-۱۰۰۰ برابر افزایش می یابد و می توانند ایجاد عفونت و یا عوارض آلرژیک نمایند که این مهم به نوع و تعداد قارچ های موجود در هوا بستگی دارد [۳، ۱]. پروپاگول های قارچی موجود در هوا، می توانند آغازگر واکنش های آلرژیک باشند، نشانه آلرژی ناشی از قارچ مانند سایر آلرژی هایی است که نسبت به آلرژن های محیطی دیگر ایجاد می شود [۲]. در اثر استنشاق عوامل قارچی موجود در هوا، میزان IgE سرمی ضد قارچ تقریباً ۴۴ درصد در افراد مستعد و ۸۰ درصد افرادی که مبتلا به آسم هستند افزایش پیدا می کند و باعث ایجاد آلرژی قارچی می شود [۳]. در بررسی که بر روی قارچ های هوا انجام شده است، مشخص شده که بیماری هایی از قبیل اتومیکوز، کراتومیکوز، برونشیت مزمن، آمفیزم، آسم و آلرژی از جمله مواردی هستند که می توانند از طریق قارچ های موجود در هوا عارض گردند [۴]. میزان جنس های قارچی که در هوا وجود دارند یک میلیون تخمین زده شده است. از آنجائیکه، اسپورهای قارچ های خاص، مسئول القاء و یا تشدید مشکلات تنفسی می باشند، شناخت ترکیب میکروفلورهای قارچی هوا برای سنجش بهبود کیفیت هوا، به کاهش مشکلات سلامتی مرتبط با بیماری های آلرژیک تنفسی (رینیت، آسم و سینوزیت)، عفونت های قارچی و مایکوزهای سیستمیک کمک می کند. اسپورهای قارچی در همه جای

دنیا وجود دارند. این موضوع که آلودگی هوا می‌تواند سلامت میلیون‌ها انسان یا حتی تمام موجودات روی زمین را تهدید کند اهمیت مطالعه و بررسی میکروبی هوا را بیش از پیش نمایان می‌سازد [۵، ۶].

از معروفترین جنس‌های قارچی ایجادکننده آلرژی آلترناریا، اسپرژیلوس و کلادوسپورریوم‌ها می‌باشند که در هوای تمام دنیا وجود آنها به اثبات رسیده است. اسپوره‌های موجود در هوای این قارچ‌ها به عنوان مهمترین عوامل ایجادکننده آسم و رنیت آلرژیک شناخته شده‌اند [۲]. زیستگاه اصلی آلترناریاها بر روی گیاهان می‌باشد. آلترناریاها جزء قارچ‌های ناقص به حساب می‌آیند که یکی از مهم‌ترین آلرژن‌های قارچی به شمار می‌روند. آلترناریاها دارای میسیلیوم‌های قهوه‌ای و تیغه دار هستند و کونیدیوفورهای آنها به صورت ساده یا سولیتاری می‌باشد که این کونیدیوفورها می‌تواند تولید اسپورهایی به صورت سولیتاری راسی یا زنجیرهای از کونیدی کنند. اسپورهایی که این قارچ‌های ناقص تولید می‌کنند از نظر شکل، اندازه، رنگ، تعداد سلول و ضخامت دیواره سلول با هم فرق دارند اگرچه ممکن است دیگر گونه‌های آلترناریاها به عنوان عوامل کلینیکال حائز اهمیت باشند اما اکثر تحقیقات بر روی گونه *آلترناریا آلترناتا* انجام گرفته است. آلترناریا یکی از آلرژن‌های اصلی است که بر روی کودکان بسیار تأثیر گذار می‌باشد این قارچ در آب و هوای معتدل دارای اسپوره‌های هوایی زیادی می‌باشد، مخصوصاً در فصل‌های تابستان و پاییز اسپوره‌های آلترناریا به میزان بالایی در دسترس می‌باشند و هم‌چنین دارای پیک بسیار بالایی در اواخر تابستان و اوایل پاییز می‌باشند. توزیع اسپوره‌های آلترناریا در آب و هوای خشک روی می‌دهد و در مناطقی که دارای بادهای زیاد و رطوبت کم می‌باشد بسیار فراوانتر است. اندازه بزرگ اسپور، آلترناریا می‌تواند مسافتی به اندازه صدها مایل از منبع اصلی خود فاصله بگیرند. میزان اسپوره‌های آلترناریاها در آب و هوای خشک و بادی به ۵۰۰ - ۱۰۰۰ اسپور در متر مکعب می‌رسد و تعداد این اسپورها در فضای خارجی به بیش از ۷۵۰۰ اسپور در هر متر مکعب می‌رسد. میزان آلرژن‌های آلترناریا در هوای داخلی و گرد و غبار فضا‌های داخلی ۱۰۰۰ - ۳ واحد بر گرم می‌باشد که برای کودکان آلرژیک زا می‌باشد. این اثبات شده است که آلرژن‌های آلترناریا به عنوان فاکتورهای مهمی در پاتوژنز آسم مطرح هستند. حساسیت به آلترناریا به عنوان یک ریسک فاکتور برای افزایش آسم شناخته شده است و هم‌چنین این حساسیت می‌تواند به عنوان یک تهدیدکننده زندگی برای افراد مبتلا به آسم تلقی شود. هم‌چنین آسم

در بچه هایی که نسبت به آلترناریا دارای حساسیت هستند بیشتر بارز می شود. در امریکا ۸۰ درصد از افرادی که دچار آسم هستند دارای واکنش مثبت به یک الی چند قارچ مختلف می باشند و ۷۰ درصد از آنها دارای حساسیت پوستی نسبت به آلترناریا می باشند. افراد حساس به آلترناریا هم چنین ممکن است در معرض ابتلا به رنیت قرار بگیرند و بسیاری از موارد ممکن است به علت حساسیت به آلترناریا در این افراد رنیت ایجاد شود. آلرژن های قارچی هم چون آلترناریا در ایجاد درماتیت نیز نقش دارند در شماری از مطالعاتی که در اروپا انجام شده، مشخص شده که افرادی که دارای شغل نانوايي، کشاورزی و باغبانی هستند حساسیت به آلترناریا در آنها بیشتر دیده می شود هم چنین آسم های فصلی که توسط آلترناریاها و ماکروسپورومها ایجاد می شود بیشتر در فصل چیدن توت فرنگی دیده شده است. آلترناریاها باعث ایجاد آسم در افرادی می شوند که با چوب زیاد سرو کار دارند. کلادوسپوریومها آسپرژیلوسها و آلترناریاها جزء قارچ هایی هستند که در باغبانان ایجاد آسم می کنند. آلرژن های قارچی تولید پروتئین هایی می کنند که این پروتئین ها مسبب اصلی ایجاد آسم می باشند و سیستم ایمنی را تحریک می کنند و گرنه اسپور های قارچی آنقدر بزرگ هستند که به الوئول های ریه نمی توانند وارد شوند. این پروتئین ها به خصوص ترشح شان در زمان اسپور زایی افزایش می یابد [۲]. آلترناریا *آلترناتا* گونه ای از جنس آلترناریا می باشد که به عنوان میکروفولور در هوا وجود دارد و جزئی از قارچ های سیاه^۱ می باشد که به عنوان یکی از مهمترین قارچ های آلرژیک شناخته شده است. Alt a1 به عنوان مهمترین آلرژن این قارچ باعث افزایش IgE در ۸۰ درصد از بیماران آسمی می شود. علاوه بر این، این قارچ دارای یک گلیکوپروتئین ۳۱ کیلو دالتونی می باشد که ۲۰ درصد از آن کربوهیدرات بوده و در سیتوپلاسم هایف و اسپور آن وجود دارد که نسبت به گرما مقاوم است و در ایجاد آلرژي نقش دارد [۷-۹].

۱-۲- جنس آلترناریا^۲

آلترناریاها از نظر تاکسونومی در سلسه قارچ ها، کلاس هیفومیست، راسته مونیلیاسه، خانواده دیماتیاسه در جنس آلترناریا قرار دارند و علاوه بر تکثیر از طریق غیرجنسی (آنامورف) دارای مرحله جنسی

1- Deuteromycetes

2- *Alternaria* spp

(تلئومورف) نیز می‌باشند که در این شرایط در کلاس آسکومیست به نام پلئوسپورا قرار می‌گیرند [۱۰]. جنس آلترناریا حدود ۵۰ گونه دارد که در این میان عمدتاً ۲ گونه آلترناریا آلترناتا و آلترناریا اینفکتوریا در انسان بیماری زاتر می‌باشند. آلترناریا برگرفته از ریشه آلتوس^۱ به معنی متغیر (تغییرات پی در پی) که اشاره به زنجیره‌ای از اسپوره‌های متناوب آن دارد که خصوصیت بارز این جنس می‌باشد [۱۱]. تمامی آنها در محیط موجود بوده و جزء قارچ‌های ساپروفیت^۲ می‌باشند. عمدتاً در خاک بوده و قادر به زندگی روی بیشتر منابع غذایی آلی از قبیل بقایای گیاهان، برگ‌های درختان، چوب در حال فساد، بقایای جانوران، توده کود حیوانی، حشرات مرده، مدفوع حیوانات، هوای محیط بیرون و درون ساختمان (سیستم تهویه هوا)، دانه‌های ذخیره شده و حتی در انسان و حیوان بیمار هم یافت می‌شوند هم چنین آلترناریا یکی از مهم‌ترین کندروهای قارچی در بذر، دانه، کاه، برگ‌ها، میوه‌های در حال فساد و گوشت‌های نمک‌سود نشده می‌باشد [۱۲]. این گروه از قارچ‌ها بیشتر در فرم میسلالیال و با اسپوره‌های غیر جنسی زندگی می‌کنند. آلترناریاها یکی از فراوان‌ترین جنس‌های قارچی هستند که در مکان‌های متنوعی در سرتاسر دنیا یافت می‌شوند و شامل گونه‌های بیماری‌زای گیاهی و پوده‌زی‌اند که موجب خسارت به بسیاری از گیاهان در مزارع یا موجب فساد تولیدات گیاهی در انبارها می‌گردند اما به ندرت در بذر چاودار رویت شده است. در مناطق معتدل، در اواخر تابستان و فصل پاییز بیشتر از هر زمان دیگر شایع می‌باشد و مهم‌ترین راه انتشار این قارچ هوا می‌باشد [۱۳-۱۵]. گونه‌های این جنس مواد سمی مختلفی را تولید می‌کنند که ممکن است در بیماری‌زایی آنها در گیاهان نقش مهمی داشته و یا منجر به آلودگی تولیدات گیاهی به این مواد سمی شده و اثرات نامطلوبی روی انسان و جانوران داشته باشند [۱۶، ۱۷]. تعدادی از گونه‌ها در ارتباط با آلودگی‌های حفره‌های بینی و مجاری تنفسی، دستگاه گوارشی، پوست و ناخن در انسان گزارش شده‌اند [۱۸-۲۰]. بعضی از گونه‌ها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیکی برای کنترل علف‌های هرز و بیمارگرهای قارچی دیگر شناخته شده‌اند [۲۱، ۲۲]. این جنس در کل در انسان مسئول ایجاد بیماری‌هایی تحت عنوان کلی آلترناریوزیس می‌باشد که شامل اختلالات آلرژیک، آسم و عفونت‌های سطحی است [۲۳]. جنس آلترناریا در سال ۱۸۱۶ توسط نیز^۳ و با گونه

1- Alternus
2- Saprophyte
3- Nees