بررسی تنوعات بین گونه‌ای برخی از گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم با استفاده از روش پکتیک زایموگرام

سید صدرالدین قائم‌مقامی[۱،*] و غلامرضا بلالی[۲]

[۱] خرمشهر، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، دانشکده علوم دریایی، گروه زیست دریا

[۲] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱

چکیده

پنی سیلیوم جنسی از رده هیفومایستها (گروهی از قارچهای ناقص) می باشد و اولین بار توسط لینک در سال ۱۸۰۹ توصیف گردید. این قارچ با دارا بودن ۱۵۰ گونه شناخته شده دارای گسترش جهانی در تمام دنیا می باشد. شناسایی گونه های مختلف پنی سیلیوم به دلیل گستردگی در طبیعت و نقش مهمی که در زندگی انسان دارند، از اهمیت خاصی برخوردار است. به طور معمول جهت شناسایی گونه‌های این جنس از روشهای مورفولوژیک استفاده می‌گردد ولی این روشها بسیار وقت‌گیر وفاقد دقت کافی می‌باشند. در دو دهه گذشته استفاده از تکنیکهای مولکولی در تمایز گونه های قارچها از جمله پنی‌سیلیوم بسیار معمول گردیده است. در این تحقیق از تکنیک پکتیک زایموگرام برای شناسایی گونه و تعیین تنوعات بین گونه‌ای در این جنس استفاده گردید. الگوهای زایموگرام به دست آمده گونه‌های این جنس را به راحتی از یکدیگر تفکیک نمود. به نظر می‌رسد این روش یک روش سریع و دقیق تری نسبت به صفات مورفولوژیک جهت شناسایی گونه‌های مختلف جنس پنی‌سیلیوم باشد.

واژه های کلیدی: پنی سیلیوم، پکتیک زایموگرام، تنوعات بین گونه ای.

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۳۲۲۲۷۰۰۱ ، آدرس پست الکترونیکی: s_sadra2003@yahoo.com

مقدمه

معرفی جنس پنی‌سیلیوم: پنی سیلیوم جنسی از رده هیفومایستها (گروهی از قارچهای ناقص) می باشد و اولین بار توسط Link در سال ۱۸۰۹ توصیف گردید. گونه های این جنس تولید زنجیری از کنیدیها را بر روی اندامهایی به اسم فیالید (که خودشان به صورت چرخه ای قرار دارند) می کنند (۲۳ و ۲۴). این قارچ با دارا بودن ۱۵۰ گونه شناخته شده دارای گسترش جهانی در تمام دنیا می باشد. برآورد اهمیت این قارچ در طبیعت و در کارهای انسان مشکل است. آنها به عنوان بزرگترین گروه از قارچها در خاک محسوب می گردند. و عده ای از آنها، سبزیجات در حال فساد را ترجیح می دهند و بعضی در زیستگاههای خشک‌تر و شرایط کم رطوبت نسبی زندگی می کنند. آنها در این زیستگاهها به عنوان قارچهای تجزیه کننده عمل می کنند (۱، ۱۲ و۲۲). *Penicillium digitatum* با تولید اتیلن سبب رسیدن زود هنگام مرکبات در انبار شده و سرانجام تمام میوه ها توسط حجم انبوهی از کنیدیهای سبز زیتونی پوشیده می گردند. گونه *P. expansum* سبب پوسیده شدن سیبهای ذخیره شده می گردد (۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۵، ۲۶ و ۲۸). کاربرد اصلی پنی سیلیوم در غرب برای به عمل آوردن پنیرهاست که به خاطر رنگ آبی این قارچ آنها را به نام پنیرهای آبی می نامند. گونه *P. roqueforti* مسئول مرغوبیت بالای پنیر Roquefort می باشد و *P. camemberti* هم برای تهیه پنیر camembert به کار می‌رود (۱، ۱۲ و ۱۸). *گونه P. marneffei* از

شگفتیهایی است که اخیراً شناسایی شده است. این قارچ ابتدا از زخمهای موش خیزران در آسیا جداسازی شده بود و هنگامی که کاشف آن به طور اتفاقی خودش را آلوده کرد، پاتوژن انسانی به حساب آمد. از آن زمان این گونه به عنوان عامل بیماری پنی‌سلیوزیس(penicilliosis) در شرق وجنوب شرقی آسیا معرفی شده است (۱ و ۱۲).

اهمیت زیاد و وجود تنوعات در این جنس نیاز به شناسایی گونه های آن را برجسته و متمایز می کند. از سوی دیگر برای فهم روابط اکولوژیکی بین گونه ها، به حداقل رساندن خسارات آنها، شناسایی دقیق گونه ها یک امر ضروری است (۴، ۵، ۱۷، ۲۲ و ۲۳).

نکته مهمی که در اینجا شایان ذکر است این مطلب است که گونه های پنی سیلیوم دارای تغییرپذیری ظاهری وابسته به شرایط محیط رشد هستند. علاوه بر این صفات ریخت شناسی معرفی شده برای گونه های مختلف از لحاظ اندازه و حالت همپوشانی و شباهتهای بسیار زیادی با هم دارند. همچنین برای تمایز گونه های این قارچ نیاز به شرایط کنترل شده و محیطهای کشت استاندارد مختلفی است که نیاز به صرف وقت زیاد جهت تهیه محیطهای کشت استاندارد برای داشتن کلیه ویژگیها، کاهش تأثیر عوامل محیطی، ناپایداری برخی از صفات و همپوشانی بسیاری از ویژگیهای بین گونه‌های مختلف این قارچ سبب شده است که کوششهایی جهت شناسایی سریع‌تر و دقیق‌تر گونه‌های پنی سیلیوم با کمک روشهای مولکولی صورت گیرد (۴، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۶، ۲۲ و ۲۳). نظر به اینکه اکثر گونه‌های پنی سیلیوم توانایی تولید آنزیمهای پکتیناز را دارند (۴، ۵،۶، ۷ و ۱۰)، در این مطالعه علاوه بر بررسی ویژگیهای مورفولوژی برای تفکیک گونه‌ها از روش زایموگرم (Zymogram) که الگوی الکتروفورزی حاصل از آنزیمهای پکتیک خارج سلولی را مورد مقایسه قرار می‌دهد استفاده گردید.

Pitt اعتقاد دارد که تنها ۷۰ تا ۸۰ درصد جدایه‌ها حتی اگر در مکانهای عادی (و نه از شرایط ویژه زیست محیطی) باشند، در حال حاضر به آسانی قابل شناسایی هستند و باقی مانده (۲۰ درصد بعدی) می توانند شناسایی شوند ولی شناسایی آنها به مهارت و تجربه زیاد تاکسونومیست متکی می باشد (۱۴، ۲۳، ۲۴و ۲۵).

کاربرد روش پکتیک زایموگرام در تعیین تنوع ژنتیکی پنی سیلیوم: بسیاری از قارچها از جمله پنی سیلیوم توانایی آزاد کردن یک سری آنزیمهای خارج سلولی جهت تجزیه پکتین دیواره سلولی اغلب گیاهان را دارند(۴، ۵، ۶، ۷، ۱۰ و ۱۱) .

اخیراً Alkorta و همکاران موفق به جداسازی یک پکتین لیاز از گونه *P. italicum* گردیده اند که این آنزیم در جریان حمله این گونه به مرکبات نقش بسیار مهمی دارد (۲).

با توجه به توانایی تولید آنزیمهای پکتیناز در اغلب گونه‌های متداول پنی سیلیوم و از آنجا که در تاکسونومی این جنس مهم از قارچها، روشهای مورفولوژیک در نشان دادن و جدا کردن برخی از تاکسونهایی که از نظر فیزیولوژیک مجزا هستند، ناقص به نظر می رسند، از این روش به عنوان یک روش آسان و سریع جهت تعیین تنوعهای درون گونه‌ای و بین گونه‌ای این قارچ می‌توان استفاده نمود. زیرا الگوهای زایموگرامی خصوصیات وسیع‌تری از ژنوتیپ را نسبت به خواص مورفولوژی در بر می گیرند(۴، ۵، ۱۰، ۱۳ و ۲۱).

مواد و روشها

نمونه‌برداری و جداسازی قارچ پنی سیلیوم: با توجه به طیف وسیع پراکنش گونه‌های مختلف قارچ پنی سیلیوم نمونه‌های مشکوک به آلودگی با این قارچ به آزمایشگاه منتقل گردید، سپس بخشهای آلوده به کپک تحت شرایط استریل و در کنار شعله با کمک اسکالپل یا لوپ استریل به

پتریهای حاوی محیط کشت PDA منتقل شد و بعد از آن پتریهای مذکور درون انکوباتوری با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شد.

تهیه کشت خالص پنی سیلیوم: پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت قارچهای رشد یافته زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و کلنیهایی که ویژگیهای پنی سیلیوم را نشان می‌دادند به محیط کشت جدید PDA منتقل شدند.

بررسیهای مورفولوژیکی: نمونه‌ها از نظر ویژگیهای ماکروسکوپی و میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند، برای شناسایی گونه‌های پنی‌سیلیوم از کشت قارچ در محیطهای کشت MEA, G25N, CYA استفاده گردید. برای بررسی صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی از کلیدشناسایی Pitt استفاده شد.

آماده سازی آنزیم پکتیناز: به ظروف شیشه‌ای کوچکی(Bijoax Bottle) که بسته به میزان رشد گونه حاوی محیط کشت مایع سیتروس پکتین به عنوان تنها منبع کربنی با pH برابر ۵/۵ بودند (۱۱)، یک بلوک به قطر ۵ میلی متر از مناطق حاشیه‌ای و در حال رشد کلنیهای مختلف پنی‌سیلیوم منتقل شد. محیطهای کشت به مدت ۱۱ تا ۱۷ روز بسته به نوع گونه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی بدون تکان قرار داده شد سپس به آرامی و بدون آسیب رساندن به میسلیوم‌ها به منظور جلوگیری از مخلوط شدن آنزیمهای پکتیناز درون سلولی با آنزیمهای پکتیناز برون سلولی، به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر مایع زیر ریسه از هر یک از محیطهای کشت مورد نظر با ۰/۰۱ گرم سفادکس(Sephadex G-200) مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد (۴، ۵، ۱۰ و ۲۹).

الکترفورز: برای انجام الکتروفورز روش Cruickshank and wade (1980) به کار گرفته شد. ژلهای پکتین آکریل آمید (Pectin-acrylamid gels) افقی نیز با روش Sweetigham و همکاران(۱۹۸۶) تهیه شد (۱۱و ۲۹). الکتروفورز روی شدت جریان ۱۶ میلی آمپر تنظیم گردید و تا پایان الکتروفورز ثابت نگهداشته شد در طی مدت انجام الکتروفوز دمای صفحه فلزی زیر ژل با عبور آب سرد ۶ درجه توسط دستگاه Thermostatic Circulator (LKB 221) سرد نگهداشته شد تا افزایش دمای ژل که بر اثر عبور جریان الکتریسیته به وجود می‌آید منجر به تقلیب آنزیمی نشود. هنگامی که فاصله طی شده توسط نشانگر برومونفل بلو به اندازه ۵ سانتیمتر به طرف قطب آند می‌رسید جریان الکتروفورز قطع گردیده و پس از الکتروفورز ژل به مدت ۱/۵ ساعت در محلول DL- مالیک اسید ۰/۱ مولار قرار گرفت. اسید مالیک pH متغیری را برای فعال شدن ایزوزیم‌های موجود در ژل ایجاد می‌کند سپس ژل با آب مقطر شسته شده و به مدت ۱۸ ساعت در محلول روتینوم قرمز دو دهم در هزار در دمای ۵ درجه سانتی گراد روی همزن قرار گرفت. روتینوم قرمز باعث مشخص شدن الگوهای باندهای آنزیمی می‌گردد، به این نحو که روتینیوم باعث قرمز شدن پکتین موجود در ژل می‌شود در نتیجه در نواحی که ایزوزیم‌های پکتیناز روی پکتیناز اثر کرده باشند رنگی متفاوت با رنگ زمینه ژل به‌وجود می‌آید. پس از شست و شوی ژل با آب مقطر استریل، به‌مدت ۲۰ دقیقه ژل در محلول آمونیوم پر سولفات قرار گرفت. سپس از ژل عکس تهیه گردید.

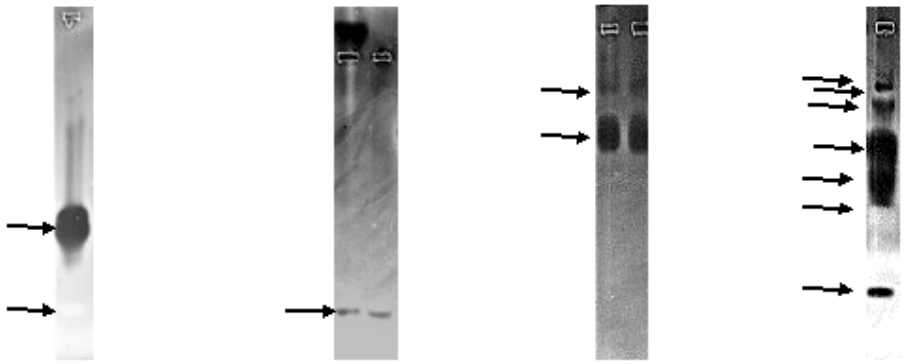
نتایج

تعداد زیادی جدایه از منابع مختلف جدا شدند و درنهایت تعداد ۱۰۰ جدایه که ویژگیهای این قارچ را نشان می دادند نگهداری شدند. با بررسیهای مورفولوژیکی بر روی این ۱۰۰ جدایه، ۱۱ گونه از لحاظ مورفولوژیکی شناسایی شدند که اسامی آنها به این شرح می باشد.

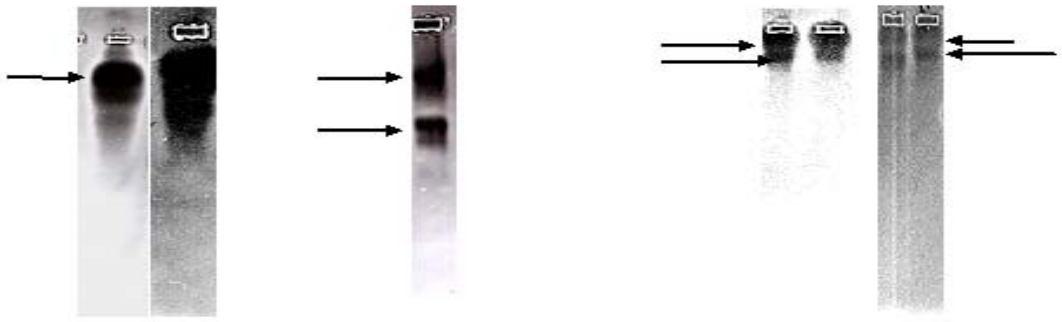
1) *Penicillium chrysogenum* 2) *P. crustosum* 3) *P.aurantiogriseum*
4) *P. miczynskii* 5) *P. waksmani* 6) *P. islandicum*
7) *P. expansum* 8) *P. commune* 9) *P. olsonii*
10) *P. griseofolvum* *11) P. corylophium*

جدایه های *P. chrysogenum* در بین این گونه ها دارای غالبیت بودند و پس از آنها غالبیت با جدایه های *P. expansum* بود.

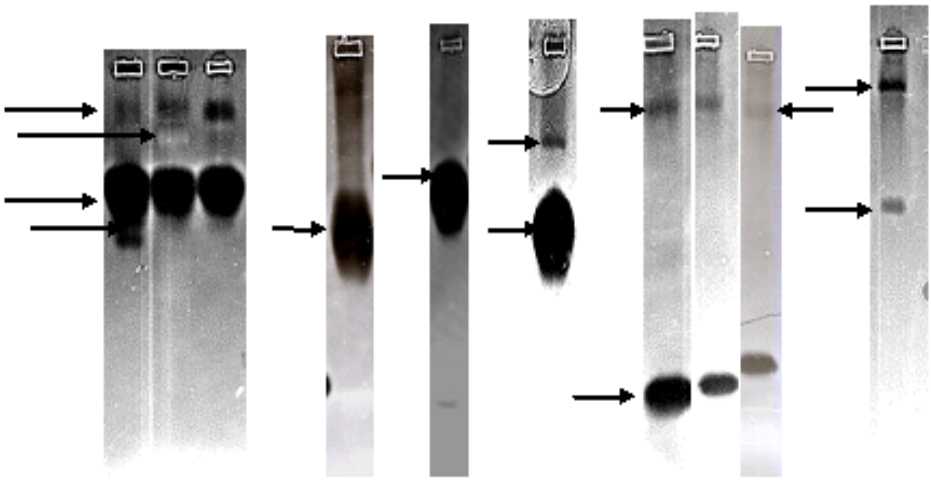
الگوهای زایموگرامی به دست آمده از این گونه‌ها: بررسیهای زایموگرامی در این قارچها نشان دادند که این گونه ها تفاوت قابل ملاحظه ای را در الگوی باندها دارند که این امر خود تفاوت فاحش در بیان ژنوتیپ را نشان می‌دهد. به عنوان مثال گونه *Penicillium miczynskii* یک باند پلی گالاکتوروناز قوی و یک باند پکتین استراز از خود نشان داد. اکثر جدایه‌های گونه *P. chrysogenum* تنها یک باند پلی‌گالاکتوروناز از خود نشان دادند، ولی در تعداد کمی از جدایه‌ها علاوه بر این باند یک باند دیگر قابل مشاهده بود. گونه *P. waksmani* دو باند پلی گالاکتوروناز را از خود به نمایش گذاشت. گونه *P. aurantiogriseum* هم دو باند پلی گالاکتوروناز و یک باند پکتین استراز ضعیف از خود به نمایش گذاشت (شکلهای ۱، ۲ و ۳).



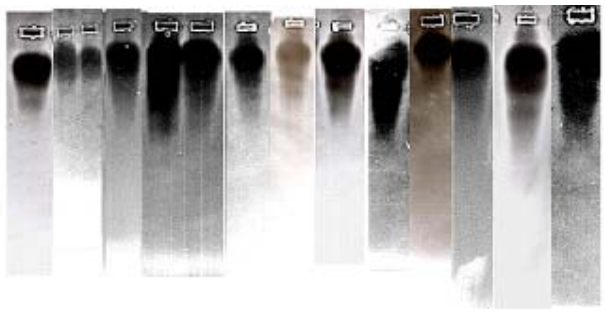
شکل ۱- تصاویر مربوط به الگوهای زایموگرامی به دست آمده از گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم (از چپ به راست): گونه *P. miczynskii* (یک الگو)، گونه *P. corylophium* (۲ الگو)، *P. waksmanii* (۲ الگو)، *P. islandicum* (۱ الگو)



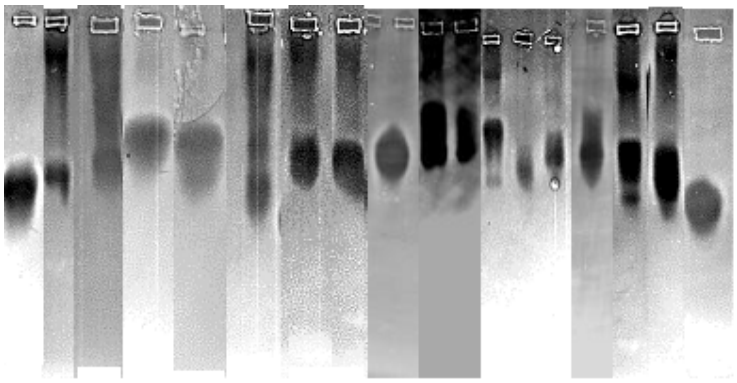
شکل ۱ (ادامه): تصاویر مربوط به الگوهای زایموگرامی به دست آمده از گونه‌های مختلف پنی‌سیلیوم (از چپ به راست): *P. expansum* (۲ الگو)، *P. aurantiogriseum* (۱ الگو)، و ۴ الگوی آخر مربوط به گونه *P. commune* می‌باشند.



شکل ۱ (ادامه)- تصاویر مربوط به الگوهای آنزیمی به دست آمده از گونه‌های مختلف جنس پنی‌سیلیوم (از چپ به راست: *P. crustosum* (۳ الگو)، *P. chrysogenum* (۳ الگو متعلق به این گونه) ، *P. olsonii* (۳ الگومتعلق به این گونه) و الگوی آخر مربوط به گونه *P. griseofolvum* می‌باشد.



شکل ۲- تصاویر مربوط به الگوهای زایموگرام به دست آمده متعلق به جدایه‌های مختلف گونه *P. expansum*



شکل ۳- تصاویر مربوط به الگوهای زایموگرام به دست آمده متعلق به جدایه‌های مختلف گونه *P. chrysogenum*

بحث و نتیجه‌گیری نهایی

شناسایی اغلب گونه‌های متعلق به قارچهای رشته‌ای مشکل می‌باشد و این امر به خوبی برای گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم قابل تعمیم است (۴، ۵، ۲۳ و ۲۴). شناسایی گونه های این جنس از ابتدا با پیچیدگیهایی همراه بوده است. از جمله عواملی که در ایجاد این پیچیدگی دخالت دارند، می توان به تعدد گونه های موجود در این جنس اشاره کرد، به طوری که برای این جنس تا کنون ۱۵۰ و در منابع دیگر ۲۰۰ گونه ذکر کرده اند. عامل دیگری که شناسایی گونه های پنی سیلیوم را با مشکل مواجه کرده است، تنوع مورفولوژی جدایه های درون یک گونه است (۴، ۵، ۲۳، ۲۵، ۲۶ و ۲۷).

در این تحقیق جدایه‌های متعلق به گونه های مختلف پنی سیلیوم که از مناطق و منابع مختلف جدا گردیدند، تنوع مورفولوژیک زیادی را نشان دادند.

الکتروفورز آنزیمهای پکتیناز خارج سلولی برای یک گروه بندی اولیه گونه‌های موجود در زیر جنس پنی‌سیلیوم توسط Cruickshank and Pitt در سال ۱۹۸۷ استفاده گردید و سپس توسط ایزوزیم های آمیلاز و ریبونوکلئاز تأیید گردید (۴، ۵ و ۱۰).

بررسیهای مورفولوژیکی ۱۱ گونه پنی سیلیوم شناسایی شده در این مطالعه نشان داد که گونه های موجود در یک بخش تشابه زیادی از لحاظ صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی دارند. مثلا در بخش (section) پنی سیلیوم ارائه شده توسط Pitt، گونه هایی وجود دارند که مشکلات تاکسونومیکی زیادی را برای تاکسونومیست‌ها ایجاد کرده اند و اختلاف نظر زیادی بر سر تاکسونومی گونه های این بخش در بین تاکسونومیستها وجود دارد. مثلا می توان از این موارد گونه *P. expansum* را ذکر کرد که مورفولوژی پنی‌سیلیوس آن بسیار شبیه به *P. chrysogenum* می باشد. همچنین از نظر مورفولوژی کلنی و رنگ آن یک ارتباط نزدیکی بین این گونه و گونه‌های *P. crustosum* و *P. viridicatum* وجود دارد و هنوز یک تاکسونومی کامل و خوب، برای گونه های این بخش به وجود نیامده است. به همین ترتیب تشابه های اشاره شده در بخشهای دیگر متعلق به زیر جنسهای دیگر مشاهده می‌گردد (۴، ۵، ۱۷و ۲۳) .

در زیر جنس دوم یعنی زیر جنس فورکاتوم، این روش به راحتی سه گونه شناسایی شده متعلق به این زیر جنس را از هم متمایز می کند، بدین نحو که در دو جدایه متعلق به گونه *P. corylophium*، دو باند پلی گالاکتوروناز ، مشاهده گردید. در گونه *P. waksamanii* ، دو باند پلی گالاکتوروناز ولی در موقعیتهای متفاوت نسبت به گونه قبلی مشاهده گردید و در گونه دیگر یعنی *P. miczynskii* ، پنج باند پلی‌گالاکتوروناز و یک باند پکتین استراز مشاهده گردید.

تنها گونه شناسایی شده متعلق به زیر جنس *Biverticillium* ، یعنی *P. islandicum*، باندهای مختلف و با شدت زیادی بر روی ژل بر جای گذاشت. بدین ترتیب که در این گونه پنج باند پلی گالاکتوروناز و دو باند پکتین استراز مشاهده شد.

ازگونه های *P. griseofolvum* ، *P. corylophium* ، *P. waksmanii*، *P. aurantiogriseum*، *P. miczynskii* ، *P. olsonii*، *P. islandicum* و *P. commune* در این تحقیق جدایه های کمی به دست آمد و همگی از لحاظ زایموگرام آزمون شدند. بر اساس الگوهای زایموگرامی به دست آمده، بین گونه های نامبرده تفاوتهای الگویی واضحی قابل مشاهده است. اما به دلیل تعداد اندک نمونه به دست آمده در مورد تنوع درون گونه ای آنها نمی توان بحث نمود. گونه های مجزا ولی مشابه از نظر مورفولوژیکی، الگوها و باندهای کاملا متفاوتی را نشان دادند.

در این تحقیق، جدایه های مربوط به یک گونه، الگوی

پکتیک زایموگرام مشابهی ایجاد کردند. این یافته ها با نتایج Cruickshank & Pitt در سال ۱۹۸۷ مطابقت دارد.

در تحقیقی که Szecsi در سال ۱۹۹۰ بر روی الگوهای زایموگرام گونه های *Fusarium* انجام داد، چنین نتیجه گیری کرد که با توجه به اینکه جدایه های وی از مناطق جغرافیایی مختلف به دست آمده بودند، پکتیک آنزیمها در طول تکامل قارچها حفظ شده اند. Cruickshank (1983) نیز توانست الگوهای پکتیک زایموگرام مشخصی برای برخی گونه های *Sclerotinia* به دست آورد (۲،۳، ۷، ۹ و۱۱).

منابع

1- Alexopoulos, C. J., Mins, C. W. and Blackwell, A. 1996. Introductory mycology. John Wiley and Sons, New York, 742 pp.

2- Alkorta, I., Garbisu, C., Llama, M. J. and Serra, J. L. 1996. Immobilization of pectin lyase from *Penicillium italicum* by covalent binding to nylon. Enzyme and Microbial Technology 18, 141-146.

3- Balali, R. and Iranpour, M. 2002. Application of pectic zymogram in the identification of genetic variation. The 7th International Mycological Congress, Oslo, Norway, 190.

4- Bridge, P. D., Hawksworth, D. L., Kozakiewicz Z., Onions, A. H. S., Paterson, R. R. M., Sackin, M. J. and Sneath, P. H. A. 1989. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological, and morphological features. 1. Numerical taxonomy. Journal of General Microbiology 135, 2941-2966.

5- Bridge, P. D., Hawksworth, D. L., Kozakiewicz Z., Onions, A. H. S., Paterson, R. R. M. and Sackin, M. J. 1989. A reappraisal of the terverticillate penicillia using biochemical, physiological, and morphological features. 2: identification. Journal of General Microbiology 135, 2967-2978.

6- Cardoso, P. G., Queiroz, M. V., Pereira, O. L. and Araujo, E. F. 2007. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. Brazilian journal of Microbiology, 38, 71-77.

7- Collmer, A. and Keen, N. T. 1986. The role of pectic enzymes in plant pathologenesis. Annual Review of Phytopathology, 24, 383-409.

8- Colombo, F., Vallone, L., Garetti, M. and Dragoni, I. 2002. Identification of *Penicillium aurantiogriseum* species with a method of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Food control 14, 137-140.

9- Cruickshank, R. H. 1983. Distinction between *Sclerotinia* species by their pectic zymograms. Transactions of the British Mycological Society 80, 117-119.

10- Cruickshank, R. H. and Pitt, J. I. 1987. Identification of species in Penicillium subgenus Penicillium by enzyme electrophoresis. Mycologia. 79, 614-620.

11- Cruickshank, R. H. and Wade, G. C. 1980. Detection of pectic Enzymes in pectin-acrylamid gels. Analytical Biochemistry, 107, 177-181.

12- Deacon, J. W. 1997. Modern Mycology. Blackwell Sciences, London. 303 pp.

13- Frisvad, J. C. 1981. Physiological criteria and mycotoxin production as aids in identification of common asymmetric penicillia. Applied and Environmental Microbiology 41, 568-579.

14- Frisvad, J. C. and Filtenborg, O. 1983. Classification of Terverticillate penicillia based on profile of mycotoxins and other secondary metabolites. Applied and Environmental Microbiology 46,1301-1310.

15- Kim, W. K., Sang, H. K., Woo, S. K., Park, M. S., Paul, N. C. and Yu, S. H. 2007. Six species of *Penicillium* associated with blue mold of Grape. Mycobiology, 35 (4): 180-185.

16- Marek, P., Annamali, T. and Venkitanarayanan. 2003. Detection of *Penicillium expansum* by polymerase chain reaction. Internatrional Journal of Food Microbiology 2756, 1-6

17- Onions, A. H. S., Bridge, P. and Paterson, R. R. M. 1984. Problems and prospects for the taxonomy of *Penicillium*. Microbiological Sciences 1, 185-189.

18- Pedersen, L. H., Skouboe, P., Boysen, M., Soule, J. and Rossen, L. 1997. Detection of *Penicillium* species in complex food samples using the polymerase chain reaction. Internatinal Journal of Food Microbiology.35, 169-177.

19- Pianzzola, M. J., Moscatelli, M. and Vero, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates

associated with blue mold on apple in Uruguay. Plant Disease 37, 23-27.

20- Piccoli-Valle, R. H, Passos, F. M., Vierina, F. J. and Silva, D. O. 2001. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* in bioreactors in the absence of inducer. Brazilian Journal of Microbiology 32, 135-140.

21- Pitt, J. I. 1987. *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. Applied and Environmental Microbiology . 53, 266-269.

22- Pitt, J. I. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species. 2nd ed. North ryde, N. S. W.: CSIRO Division of Food Processing., 185 pp.

23- Ramirez, C. 1982. Manual and atlas of the Penicillia. Elsevier Biochemical Press, Amsterdam. 885.

24-Samson, R. A., Hoekstra, E. S., Frisvad, J. C. and Filtenborg, O. 2000. Introduction to food- and airborne fungi. Ponsen and Looyen, Wageningen, The Netherlands, 389 pp.

25- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P. and Frisvad, J. C. 2004. Phylogenetic analysis of *penicillium* subgenus *Penicillium* using partial β–tubulin sequences. Studies in Mycology, 49: 175-200.

26- Skouboe, P., Frisvad, J. C., Taylor, J. W., Lauritsen, D., Boysen, M. and Rosen, L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. Mycological Research 103(7), 873-881.

27- Sweeney, M. J. and Dobson, A. D. W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology 43, 141-158.

28- Sweetingham M. W., Cruickshank, R. H., and Wong, D. H. 1986. Pectic zymogram and taxonomy and pathogenicity of the Ceratobasidiaceae. Transaction of the British Mycological Society 86, 305-311.

29- Szeczi, A. 1990. Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* species. Journal of Phytopathology 128, 75-83.

Using pectic zymogram technique to identify interspecies variation of some *Penicillium* species

Ghaemmaghami S. S.[1,*] and Balali G. R.[2]

[1] Marine Biology Dept., University of Marine Science and Technology, Khoramshahr, I.R. of Iran

[2] Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Penicillium is a genous of Hyphomycetes (a group of Deuteromycetes) and was created by Link in 1809. This fungi with 150 recognized species has a worldwide distribution. The world-wide distribution and the importance of the role of the genus in human life are the reasons that make the identification of the species of this genus important. Some *Penicillium* species are responsible for hard disease. Because of producing a wide varity of enzymes, the species of this genus are important elements in industry and agriculture. Basically the morphological characters use to identify the species of *Penicillium*, but such identification is time consuming and lack of high accuracy. During last two decades using molecular and biochemical techniques have been vastly used in fungal species identification including *Penicillium*. In this study pectic zymogram technique was used to identify *Penicillium* species and inter-specific variations. Based on obtained zymogram patterns it seems that this technique is quick and more reliable than using morphological characters to distinguish different species.

Key words: *Penicillium*, Pectic Zymogram, Inter-specific variations.