

مقایسه نواحی ژنی ITS-rDNA و *tefla* در بررسی ارتباط تبارزایی بعضی گونه‌های *Trichoderma*

مهدی مهرابی کوشکی^{۱*}، مریم باورساد^۲، رضا فرخی نژاد^۳، مهدی جمشیدی^۴ و اشکان علی محمدی^۴
 ۱، ۲، ۳ و ۴. استادیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد و دانشجویان کارشناسی، بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۵)

چکیده

جنس *Trichoderma* فارچی تک‌نمایی است که بعضی از گونه‌های آن به‌عنوان عامل کنترل زیستی (بیوکنترل) شناخته می‌شوند. در این بررسی، یازده جدایه از هفت گونه *Trichoderma* شامل *T. koningiopsis*، *T. asperellum*، *T. pleuroticola*، *T. capillare*، *Trichoderma harzianum*، *T. brevicompactum* و *T. virens* برای بررسی ارتباط تبارزایی (فیلوژنتیکی) آن‌ها با یکدیگر و با توالی گونه‌های مرجع ثبت‌شده در بانک ژن و ISTH استفاده شد. توده میسلیومی رشد کرده در محیط PDB با استفاده از کاغذ صافی گردآوری و پس از خشک-انجماد کردن، DNA ژنگانی (ژنومی) آن استخراج شد. نواحی ITS-rDNA و اینترون ۲، ۳ و ۴ از *tefla* با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی افزایش و توالی‌یابی شدند. بررسی تبارزایی با الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و انتخاب مناسب‌ترین مدل جانمایی نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 انجام شد. همه درختان تبارزایی حاصل، کلادهای معتبری برای بیشتر جدایه‌ها تولید کردند که ارتباط به نسبت یکسانی را از آن‌ها نشان داد. در همه درختان تبارزایی به‌جز درخت مبتنی بر داده‌های حاصل از توالی‌یابی ناحیه ITS، جدایه‌های *T. koningiopsis* و *T. asperellum* یک کلاد قاعده‌ای معتبر ایجاد کردند. نتیجه بررسی تبارزایی که بر پایه توالی نواحی مختلف *tefla* اینترون ۲ و ۳، اینترون ۴ و هر سه اینترون، برای گونه‌های *T. brevicompactum*، *T. virens*، *T. koningiopsis* و *T. pleuroticola* به دست آمد کلادهای معتبرتری نسبت به درخت حاصل از تجزیه توالی‌های ITS نشان داد. تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه که بر پایه توالی اینترون ۴ از *tefla* انجام شد، کلادهای معتبری برای بیشتر جدایه‌های *Trichoderma* از جمله *T. asperellum* ایجاد کرد. این نتایج تأیید می‌کند که تبارزایی مبتنی بر اینترون ۴ از *tefla* گروه‌بندی تبارزایی مناسبی برای گونه‌های تریکودرما فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *Trichoderma*، ITS، *tefla* و درست‌نمایی بیشینه.

The comparison of ITS-rDNA and *tefla* genomic regions for phylogenetic study of some *Trichoderma* Species

Mehdi Mehrabi-Koushki^{1*}, Maryam Bavarsad², Reza Farrokhinejad³, Mehdi Jamshid⁴
 and Ashkan Alimohammadi⁴

1, 2, 3, 4. Assistant Professor, Former M. Sc. Student, Professor and B. Sc. Students, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

(Received: Sep. 14, 2015 - Accepted: May 4, 2016)

ABSTRACT

Genus *Trichoderma* is a monophyletic fungus which some their species is known as biocontrol agent. This study was carried out for phylogenetic analysis of some isolates of the genus *Trichoderma*. In this study 73 sequences (including 33 sequences from *T. asperellum*, *T. brevicompactum*, *T. capillare*, *T. harzianum*, *T. koningiopsis*, *T. pleuroticola* and *T. virens* and 40 sequences obtained from GeneBank and ISTH) were used in phylogenetic analysis. The biomass of isolates grown in PDB was harvested by filter paper. The genomic DNA was extracted from mycelia after freeze-drying. The regions of ITS-rDNA, *tefl1/In2-3* and *tefl1/In4* were amplified using common and specific primers and then sequenced. The data analyzed using maximum likelihood (ML) algorithm through selecting the best-fitting nucleotide substitution model in MEGA 6 software. The results showed that all phylograms present relatively similar relationships for isolates among supported clades. In all gene trees except ITS-based phylogram, the isolates of *T. koningiopsis* and *T. asperellum* were positioned within a basal clade with strong bootstrap support. The *tefl1*-based phylogeny showed a stronger supported clade for the species of *T. brevicompactum*, *T. virens*, *T. koningiopsis* and *T. pleuroticola* compare to ITS-based phylogeny. The *tefl1/In.4* based ML analysis generated supportive clade for *Trichoderma* isolates such as *T. asperellum*. This study confirms that *tefla/Intron4*-based phylogeny provide reliable clustering for *Trichoderma* species.

Keywords: ITS, maximum likelihood, *tefla*, *Trichoderma*.

مقدمه

Trichoderma یک جنس قارچی با مرحله جنسی *Hypocrea* است (Kullnig-Gradinger et al., 2002). گونه‌های *Trichoderma* اغلب به فراوانی در خاک‌های کشاورزی وجود دارند و بسیاری از آن‌ها به‌عنوان عامل‌های کنترل زیستی (بیوکنترلی) علیه بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کنند (Harman et al., 2004). همچنین برخی اعضای این جنس از تولیدکننده‌های صنعتی بعضی از آنزیم‌ها مانند سلولاز هستند (Mehrabi-Koushki et al., 2011, 2012).

رده‌بندی (سیستماتیک) مولکولی مبتنی بر توالی‌های DNA در قارچ‌شناسی تکاملی منجر به تغییرپذیری‌های آرایه‌بندی (تاکسونومیک) زیادی شده است و قارچ *Trichoderma* نیز متأثر از این تغییرپذیری‌ها بوده است (Druzhinina et al., 2010). توالی ناحیه ITS-rDNA به‌طور گسترده برای کشف ارتباط تبارزایی (فیلوژنتیکی)، شناسایی و جداسازی برخی گونه‌های دو جنس *Trichoderma* و *Hypocrea* استفاده شده است (Druzhinina and Kubicek, 2005)، اما قادر به جداسازی برخی گونه‌های نزدیک به هم نیست. ژن *tefla* یک ناحیه ژنی مناسب برای بارکدینگ و تبارزایی گونه‌های *Fusarium* (Geiser et al., 2004) و *Trichoderma* (Druzhinina & Kubicek, 2005) شناخته شده است. استفاده از چندین ناحیه ژنی منجر به معرفی چندین گونه جدید از درون جمعیت‌های گونه‌های مرکب این جنس شده است (Druzhinina et al., 2010). امروزه توالی‌یابی بعضی از ژن‌های شاخص همچون *rpb2*، *tefla*، β -tubulin، *calmodulin* و *chi18-5* و استفاده از آن‌ها به‌صورت انفرادی یا چندگانه در بررسی تبارزایی جنس *Trichoderma* و تشخیص گونه‌های تبارزایی (GCPSR) آن، دقیق‌ترین روش برای جداسازی گونه‌های این جنس است (Druzhinina et al., 2006; Druzhinina et al., 2012).

با در نظر گرفتن اینکه در یک دهه اخیر با گسترش بررسی‌های مولکولی شمار گونه‌های *Trichoderma* افزایش یافته است این تحقیق سعی دارد تا در سطح مولکولی با افزایش و توالی‌یابی

بخش‌هایی از ژن‌های rDNA و *tefla* از یازده جدایه بومی *Trichoderma*، ارتباط تبارزایی آن‌ها را با یکدیگر و با سویه یا جدایه (استرین)‌های مرجع در بانک ژن و ISTH بررسی کند.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های *Trichoderma* و خالص‌سازی

در این بررسی یازده جدایه متعلق به هفت گونه *T. capillare*، *T. brevicompactum*، *T. asperellum* و *T. pleuroticola*، *T. koningiopsis*، *T. harzianum* و *T. virens* تهیه‌شده از مجموعه قارچ‌های زنده گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده شد. به‌منظور تهیه پرگنه‌های جوان و در حال رشد قارچ، این جدایه‌ها به ظرف‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز آگار منتقل شدند. تشتک‌های پتری برای اسپوردهی قارچ در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در شرایط روشنائی به مدت یک تا چهار هفته (بسته به نوع جدایه) قرار داده شدند. پس از اسپوردهی، دروایه (سوسپانسیون) اسپور با استفاده از آب مقطر سترون محتوی ۰/۱ درصد توین ۸۰ تهیه شد. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور روی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز آگار کمینه (۱/۴ strength PDA) انجام شد (Ainsworth, 1971).

تولید زیست‌توده قارچی و استخراج DNA

اسپورهای *Trichoderma* با نسبت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر به ظرف‌های حاوی محیط کشت PDB اضافه شده و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۲۸ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. با استفاده از قیف و گاز سترون، توده میسلیومی رشدیافته در محیط کشت‌های مایع PDB گردآوری و با آب مقطر سترون شستشو شد. توده میسلیومی بی‌درنگ پس از آب‌گیری اولیه، به لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت دو ساعت در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. سپس در پوشش لوله‌ها با قطعه‌های گاز سترون جایگزین و در دستگاه لیوفیلیزر که پیشتر در دمای حدود ۵۵- درجه سلسیوس تنظیم شده بود، قرار داده شد و پس‌از آن پمپ خلأ روشن شد. نمونه‌ها در

Taq ۰/۵ میکرولیتر آنزیم (2.5 μ m each) DNA Polymerase (5u/ μ l)، ۲ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر دو بار تقطیرشده میلی کیور تا حجم ۵۰ میکرولیتر تهیه و افزایش در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ MiniTM Gradient Thermal Cyclor) با برنامه انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک چرخه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه با دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۱ چرخه سلسیوس (برای ITS) به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۷ چرخه سلسیوس (برای *tefl* α) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ چرخه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و یک چرخه افزایش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

خالص‌سازی قطعه‌های افزایشی و توالی‌یابی

محصولات PCR مربوط به هر جدایه به روش رسوب با اتانول تغلیظ و شستشو شد (Crouse & Amorese, 1987). برای این منظور، یک‌دهم حجم محصول، استات سدیم ۳ مولار با pH ۵/۴ و ۲-۳ برابر حجم آن اتانول مطلق اضافه و به مدت یک شب در دمای ۸۰- نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت بیست دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و در ۱۰۰۰۰ xg سانتریفیوژ و رسوب به‌دست‌آمده با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. رسوب نهایی در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر میلی کیور حل و برای توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مستقیم و معکوس به شرکت ماکروژن ارسال شد.

تجزیه توالی‌ها و ارزیابی تبارزایی جدایه‌های

Trichoderma

ارتباط تکاملی و تبارزایی جدایه‌های این آزمایش با توالی‌های مربوط به گونه‌های تأییدشده و مرجع ثبت‌شده (جدول ۱) در پایگاه اطلاعات ژنگان (ژنوم) کمیسیون بین‌المللی برای آرایه‌بندی *Trichoderma* و *Hypocrea* یا ISTH (<http://www.isth.info>)^۱ و بانک ژن NCBI انجام شد. انتخاب توالی جدایه‌های مرجع (نمونه تیپ، ISTH و تأییدشده) بر پایه نواحی

مدت شانزده ساعت نگهداری در این شرایط، خشک-انجماد شدند. توده میسیلیومی خشک‌شده به هاون چینی سترون منتقل و با استفاده از دسته‌هاون درون نیتروژن مایع پودر شد. پودر ایجادشده هر نمونه در همان لوله مرحله خشک-انجمادی گردآوری و برای جلوگیری از جذب رطوبت با پارافیلیم مسدود شد و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جداسازی DNA به روش Raeder & Broda (1985) با اندکی تغییر انجام گرفت. در این روش، ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از پودر میسیلیومی با استفاده از بافر تخریب به لیزات تبدیل و سپس در سه مرحله متوالی با استفاده از فنل:کلروفرم: ایزوآمیل‌آلکل پروتئین‌زدایی و خالص‌سازی شد. پس از نخستین مرحله خالص‌سازی، با استفاده از RNase A تیمار و سپس دو مرحله بعدی خالص‌سازی انجام گرفت. درنهایت DNA با روش رسوب با اتانول (Ethanol Precipitation) گردآوری و با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. DNA به‌دست‌آمده با بارگذاری روی ژل آگاروز ۱ درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت در مدت یک ساعت الکتروفورز و همچنین با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکتروفتومتر، مدل eppendorf BioPhotometer plus) کمی و کیفیت آن ارزیابی شد.

افزایش ژن‌های ITS و *tefl* α

برای افزایش حدود ۷۰۰ bp از ناحیه ITS، از جفت آغازگر عمومی ITS1-F (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4-R (TCCTCCGCTTATTGATATGC) استفاده شد (White *et al*, 1990). همچنین برای افزایش حدود ۹۰۰ bp از ژن *tefl* α (از اگزون ۱ تا اگزون ۵) از جفت آغازگر اختصاصی *tefl*171-F (CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC) و *tefl*1997-R (CAGTACCGGCRGCRATRATSAG) استفاده شد (Shoukouhi & Bissett, 2008). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۵ میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، غلظت نهایی ۳ میلی‌مولار از MgCl₂، ۳ میکرولیتر آغازگر مستقیم (10 μ m)، ۳ میکرولیتر آغازگر معکوس (10 μ m)، ۴ میکرولیتر از مخلوط

1. International Subcommission on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy

نتایج و بحث

پس از ارزیابی توالی‌های مربوط به جدایه‌های مورد آزمایش، توالی‌های تأییدشده ITS و *tefla* در پایگاه اطلاعات داده‌های ژنگانی NCBI نمایه شدند (KP985646 to KP985636 برای ITS و KP985647 و KP985655 to *tefla*). توپولوژی درختان ترسیمی بر پایه توالی نواحی ITS، اینترون ۲ و ۳ از *tefla* اینترون ۴ از *tefla* (اینترون ۲، ۳ و ۴) و ترکیب توالی‌های ITS-*tefla* نشان داد که در همه درختان تبارزایی به جز درخت مبتنی بر ITS، جدایه‌های *T. koningiopsis* و *T. asperellum* یک کلاد قاعده‌ای معتبر (با ارزش کلاد ۱۰۰-۸۹ درصد) ایجاد کردند (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

بررسی تبارزایی جدایه‌ها بر پایه توالی ناحیه ITS
پس از تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه با هزار بار نمونه‌گیری کاذب برای ارزیابی ارزش کلادها^۳، گروه‌بندی جدایه‌ها در قالب درخت تبارزایی ارائه شد (شکل ۱-ا). بر پایه این گروه‌بندی تبارزایی، جدایه‌های گونه *T. harzianum* و *T. brevicompactum* به ترتیب بارزش کلاد ۹۱ درصد و ۹۳ درصد هرکدام در یک گروه گونه‌ای قرار گرفتند. جدایه‌های *T. virens* دو کلاد بارزش ۹۹ درصد و ۸۶ درصد ایجاد کردند. جدایه‌های گونه *T. asperellum* و *T. koningiopsis* در کلادهای ترکیبی خوشه‌بندی شدند و پنج گروه تبارزایی ایجاد کردند. جدایه *T. capillare* ISf-7 با دو جدایه از *T. saturnisporum* کلادی با ارزش ۹۸ درصد ایجاد کردند. جدایه‌های گونه *T. pleuroticola* در سه گروه تبارزایی خوشه‌بندی شدند.

بررسی تبارزایی جدایه‌ها بر پایه توالی نواحی اینترون ۲ و ۳ از *tefla* اینترون ۴ از *tefla* و *tefla*
هر سه درخت تبارزایی به‌دست‌آمده از توالی نواحی اینترون ۲ و ۳ از *tefla* اینترون ۴ از *tefla* و هر سه اینترون ژن *tefla* به‌جز جدایه‌های *T. asperellum* و *T. pleuroticola* توپولوژی به‌نسبت یکسانی داشتند، هرچند، ارزش کلادهای ایجادشده متفاوت بود

افزایشی ژنگان و دست‌کم ۸۰ درصد همپوشانی ژن‌های ITS و *tefla* انجام گرفت. در مواردی که برای یک گونه توالی‌های هر دو ژن در پایگاه‌های اطلاعات ژنگان وجود نداشت، جدایه‌های جداگانه برای هر ژن انتخاب شد. برای ارزیابی تبارزایی مبتنی بر نواحی ITS، با توجه به نبود توالی ITS از گونه *T. capillare* در پایگاه اطلاعات ژنگان، از توالی مربوط به گونه نزدیک *T. saturnisporum* استفاده شد. در مورد این‌گونه در مقایسه جدایه‌ها بر پایه کل نواحی افزایشی *tefla* نیز از گونه بالا استفاده شد، زیرا برای گونه *T. capillare* تنها توالی نواحی اینترون شماره ۴ ژن *tefla* در بانک ژن موجود است. از توالی گونه *Neonectria macroconidialis* به‌عنوان outgroup برای ریشه‌دار کردن درختان تبارزایی استفاده شد.

توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) ویرایش شدند. خوانش‌های مستقیم و معکوس هر ژن برای هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار DNA Baser Sequence Assembler v4 مونتاژ و به‌عنوان توالی تصحیح‌شده نهایی در تجزیه تبارزایی و ترسیم درخت استفاده شدند. برای رسم درخت تبارزایی، توالی نواحی ITS اینترون ۲ و ۳ از *tefla* اینترون ۴ از *tefla* (اینترون ۲، ۳ و ۴) و ترکیب توالی‌های *tefla*-ITS به‌صورت جداگانه و با استفاده از برنامه ClustalW در نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 هم‌راستا شدند. برای توالی ترکیبی، در آغاز توالی‌های هم‌راستاشده هر ژن، هم‌وزن و با تعیین نواحی محافظت‌شده همانند به‌عنوان نقطه آغاز و پایان توالی مونتاژ شدند و سپس در تجزیه و تحلیل تبارزایی وارد شدند. بررسی تبارزایی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (ML)^۱ که از نظر مدل تکاملی همانند روش BI^۲ است و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6، انجام شد (Tamura *et al.*, 2013). ارزیابی بهترین مدل برای هر گروه توالی با استفاده از همین نرم‌افزار انجام شد و مدل Kimura 2-parameter model (K2+G) برای همه توالی‌ها به‌غیر از *tefla*/In4 (K2+G+I) استفاده شد.

1. Maximum likelihood
2. Bayesian inference

3. Bootstrap

جدایه‌های گونه *T. asperellum* به‌غیر از درخت مبتنی بر اینترون ۴ در دو گروه تبارزایی قرار گرفتند. در هر سه درخت، جدایه‌های گونه *T. harzianum* بر پایه نواحی اینترون ۲ و ۳، اینترون ۴ و هر سه اینترون ژن *tefla* در سه کلاد خوشه‌بندی شدند. جدایه *H. lixii* PPRC-ET47 در هر سه درخت، در کنار جدایه‌های گونه *T. capillare* و *T. saturnisporum* قرار گرفت (شکل‌های ۱-ب و ۲).

(شکل‌های ۱-ب و ۲). جدایه‌های مربوط به گونه‌های *T. koningiopsis* و *T. brevicompactum*، *T. virens* هرکدام کلادهای مستقلی با ارزش قابل قبول ۱۰۰-۹۴ درصد ایجاد کردند. جدایه‌های گونه *T. pleuroticola* بر پایه دو ناحیه اینترون ۲ و ۳ و هر سه اینترون افزایشی یک کلاد مستقل به ترتیب با ارزش ۹۹ درصد و ۱۰۰ درصد ایجاد کردند ولی بر پایه ناحیه اینترون ۴ در دو کلاد با ارزش ۹۴ درصد خوشه‌بندی شدند.

جدول ۱. توالی‌های مورد استفاده از ISTH و بانک ژن برای استفاده در بررسی‌های تبارزایی
Table 1. The genome data used from ISTHT and GenBank for phylogenetic analysis

Species name	Strain name	Origin*	Accession Numbers	
			ITS sequence	<i>tefla</i> sequence
<i>H. lixii</i>	DAOM 233986	Kubicek group	EF392757	EF392749
<i>H. lixii</i>	PPRC-ET47	Kubicek group	FJ461580	FJ763182
<i>H. lixii</i>	CIB T02	Colombia	EU280079	EU279976
<i>T. lixii</i>	CBS 110080	TYPE material	NR131264	-
<i>T. harzianum</i>	CBS 226.95	TYPE material	-	AY605833
<i>H. virens</i>	CIB T06	Colombia	EU280079	EU280059
<i>T. virens</i>	V-22	India	KF144637	KF668119
<i>T. virens</i>	CBS_249.59	ISTH	-	-
<i>T. virens</i>	GJS-01-287	ISTH	-	-
<i>T. asperellum</i>	ST1	Morocco	KJ652493	KJ677260
<i>T. asperellum</i>	TV13	India	JN104493	JN104508
<i>T. asperellum</i>	CBS 433.97	TYPE material	NR_130668	AY376058
<i>T. brevicompactum</i>	DAOM 233362	Colombia	EU280088	EU280056
<i>T. brevicompactum</i>	GXNN2002	TYPE material	-	JQ040332
<i>T. koningiopsis</i>	DAOM 229982	Colombia	EU280141	EU280028
<i>T. koningiopsis</i>	CBS 119075	TYPE material	NR_131281	-
<i>T. koningiopsis</i>	GJS 93-20	TYPE material	-	DQ284966.1
<i>T. pleuroticola</i>	FJFZ5007	China	JQ040379	JQ040428
<i>T. pleuroticola</i>	T1295	Colombia	EU280071	EU279973
<i>T. pleuroticola</i>	CBS 124383	TYPE material	NR_134420	-
<i>T. pleuroticola</i>	CBS 124383	TYPE material	-	HM142381
<i>T. brevicompactum</i>	Cornell9	ISTH	-	-
<i>N. macroconidialis</i>	-	-	JF735259	JF735693
<i>T. saturnisporum</i>	RCT13	India	KC874898	-
<i>T. saturnisporum</i>	-	TYPE material	NR103704.1	-
<i>T. saturnisporum</i>	IMI 146852	Kubicek group	-	AY865642
<i>T. capillare</i>	GJS 06-66	Samuel group	-	JN175585
<i>T. capillare</i>	C.P.K. 2883	TYPE material	-	JN182283

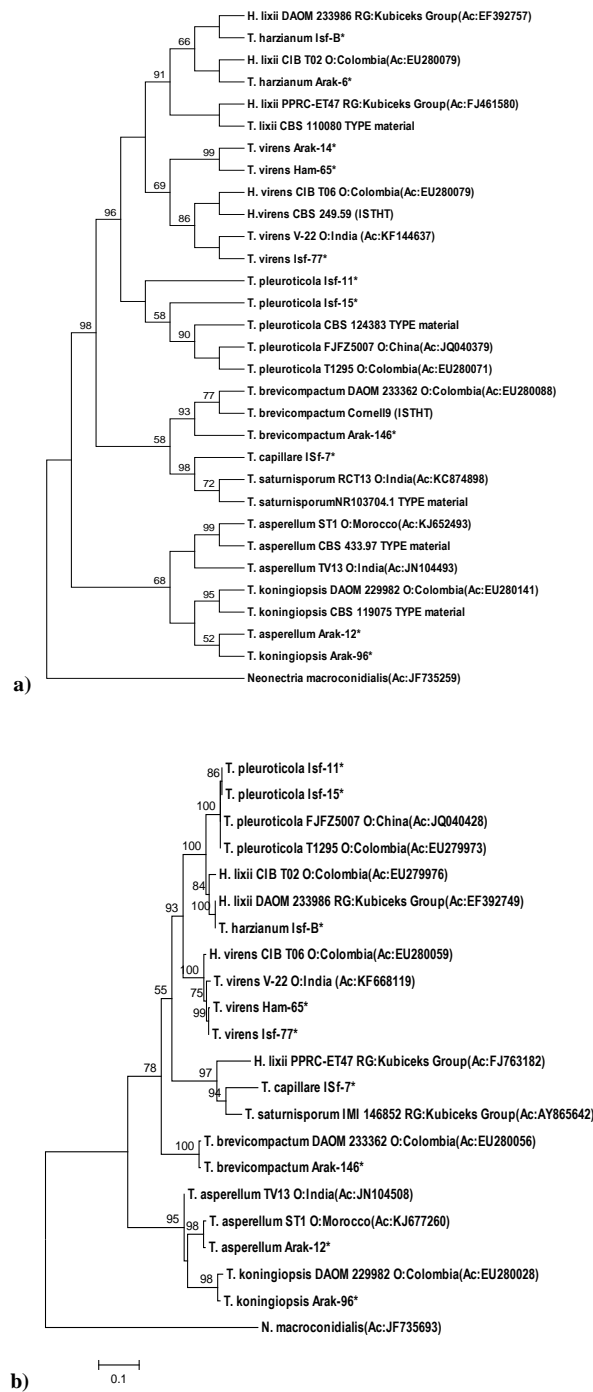
* توالی‌هایی که مبدأ آن در بانک ژن اشاره نشده است بانام گروه تحقیق آورده شده است. در غیبت توالی مربوط به نمونه تیپ از مجموعه توالی گونه‌های تأیید شده ISTH استفاده شده است.

* The sequences with unclear origin in GenBank mentioned under research group name. In the lack of type specimens based sequences, the sequence collection belong to confirmed species from ISTH were used.

کردند. جدایه‌های مربوط به گونه *T. harzianum* در دو گروه خوشه‌بندی شدند. سه جدایه *T. harzianum* Isf- B، *H. lixii* CIB T02 و *T. harzianum* DAOM 233986 یک گروه تبارزایی جداگانه ایجاد کردند. همچنین جدایه *T. harzianum* PPRC-ET47 در کنار گونه *T. capillare* قرار گرفت. جدایه‌های گونه *T. asperellum* نیز در دو گروه تبارزایی جداگانه قرار گرفتند.

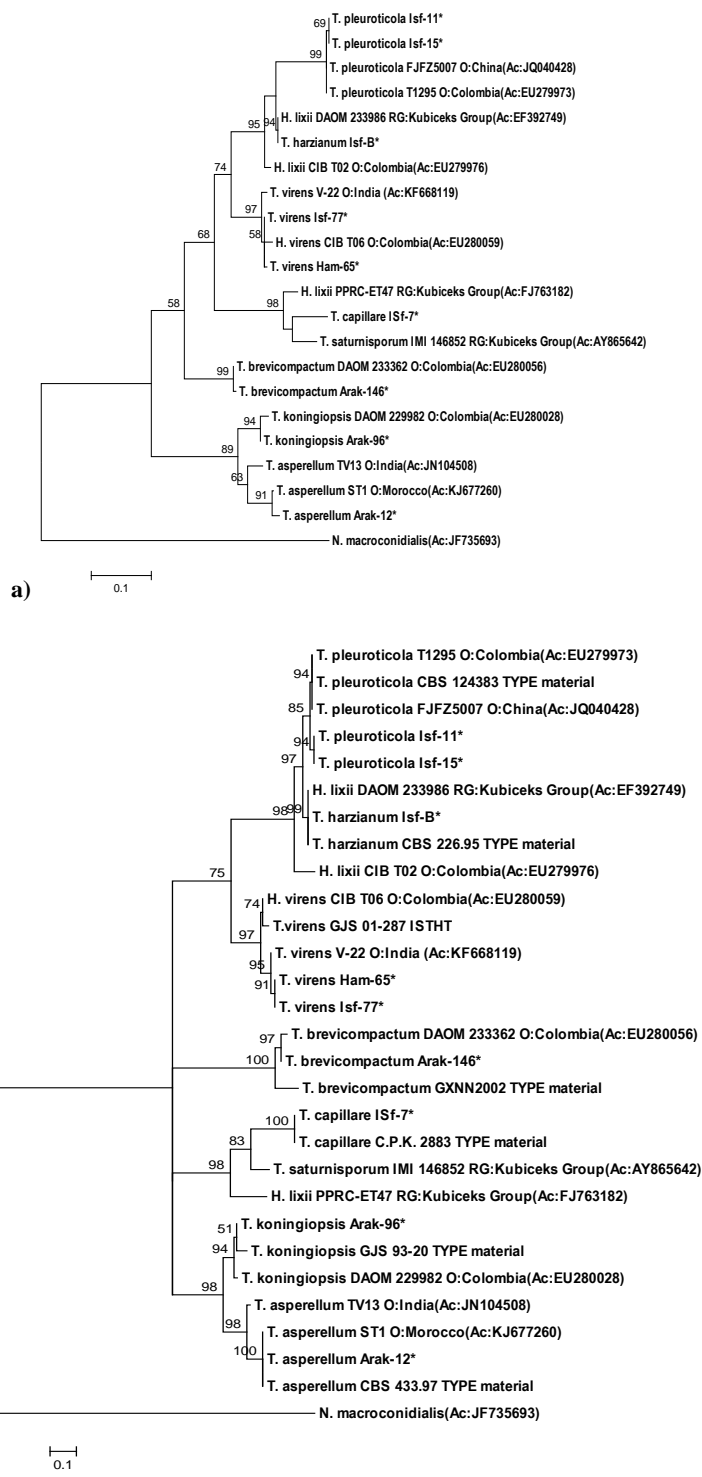
بررسی تبارزایی جدایه‌ها بر پایه نواحی ترکیبی ITS-tefla

الگوی انشعابات (توپولوژی) درخت تبارزایی ناشی از توالی‌های ترکیبی ITS-tefla، نزدیک به همانند درختان مبتنی بر ناحیه *tefla* بود (شکل ۳). جدایه‌های مربوط به گونه‌های *T. brevicompactum*، *T. virens* و *T. pleuroticola* به ترتیب کلادهای مستقل با ارزش ۹۹، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد ایجاد



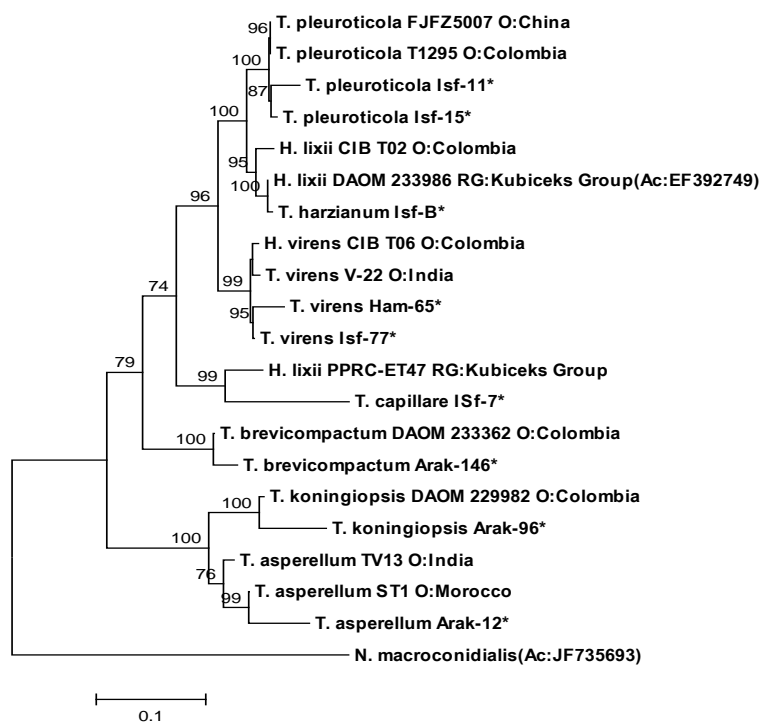
شکل ۱. درختان تبارزایی جداییه‌ها که در تجزیه درست‌نمایی بیشینه بر پایه نواحی ITS (a) و *tefla* (b) با استفاده از مدل K2+G به دست آمده است. درصد تکرار کلادها در هزار بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استراپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. در غیبت توالی ITS و توالی هم‌وزن ناحیه *tefla* گونه *T. capillare* از دو جداییه گونه نزدیک *T. saturnisporum* استفاده شده است. درخت با استفاده از گونه نزدیک *Neonectria macroconidialis* ریشه‌دار شده است. به‌علت ظهور انشعاب‌های چندشاخگی، درخت ITS با فرمت Consensus tree ترسیم شده و طول شاخه‌ها کاذب است.

Figure 1. The phylogram of isolates constructed using maximum likelihood analysis based on ITS (a) and *tefla* (b) sequences under K2+G model. The percentages of replicate trees in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. In the lack of ITS sequence and *tefla* equal-weight sequence for *T. capillare* in GenBank, two *T. saturnisporum* strains were used as close species. The tree was rooted to close species of *N. macroconidialis*. Due to the appearance of polytomous topology, the tree based on ITS was shown as Consensus tree with lost branch lengths.



شکل ۲. درختان تبارزایی جداییه‌ها که در تجزیه درست‌نمایی بیشینه بر پایه نواحی *tefl*α/ln.2-3 (a) و *tefl*α/ln.4 (b) به ترتیب با استفاده از مدل K2+G و K2+G+I به دست آمده است. درصد تکرار کلادها در هزار بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استراپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. در غیبت توالی هم‌وزن ناحیه *tefl*α گونه *T. capillare*، از یک جداییه گونه نزدیک *T. saturnisporum* استفاده شده است. درخت با استفاده از گونه نزدیک *Neonectria macroconidialis* ریشه‌دار شده است.

Figure 2. The phylogram of isolates constructed through maximum likelihood analysis based on *tefl*α/ln.2-3 (a) and *tefl*α/ln.4 (b) regions under K2+G and K2+G+I models, respectively. The percentages of replicate trees in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. In the lack of *tefl*α equal-weight sequence for *T. capillare* in GenBank, a *T. saturnisporum* strain was used as close species. The tree was rooted to close species of *N. macroconidialis*.



شکل ۳. درخت تبارزایی جدایه‌ها که در تجزیه درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی‌های ترکیبی *ITS-tefla* با استفاده از مدل K2+G به دست آمده است. درصد تکرار کلادها در هزار بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استراپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. درخت با استفاده از گونه نزدیک *Neonectria macroconidialis* ریشه‌دار شده است.

Figure 3. The phylogram of isolates constructed through maximum likelihood analysis based on *ITS-tefla* combined sequence under K2+G model. The percentages of replicate trees in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree was rooted to close species of *N. macroconidialis*.

مختلف ژن *tefla* (اینترون‌های ۲، ۳ و ۴) در جداسازی آرایه (تاکسون)‌ها نشان می‌دهد، که بالاترین تنوع بین‌گونه‌ای و همانندی درون‌گونه‌ای در اینترون ۴ وجود دارد و کلادهای معتبرتری از تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه در درختان ژنی ناشی از آن به دست آمد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، اینترون ۴ نسبت به اینترون ۲ و ۳ ژن *tefla* نشانگر مناسب‌تری در تبارزایی گونه‌های *Trichoderma* است. نگاهی به تبارزایی جدایه‌های *T. asperellum* در درخت ژنی مبتنی بر اینترون ۴ نسبت به *ndv* درختان ژنی نقش جداسازی گونه‌ای بهتر این ناحیه ژنی را به خوبی نشان می‌دهد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). این نتایج با بررسی‌های گذشته (Samuels *et al.*, 2006; Jaklitsch *et al.*, 2006) که در آن به نقش اینترون‌های ژن *tefla* به‌عنوان یک DNA-بارکدینگ مناسب و نشانگر معتبر برای بررسی تبارزایی اشاره شده است، همخوانی دارد. موقعیت تبارزایی *T. harzianum* نشان داد، جدایه‌های

بحث

بر پایه نتایج این بررسی دو ناحیه ژنی *ITS* و *tefla* قابلیت نسبی مناسبی برای جداسازی گونه‌های جنس *Trichoderma* دارند، ولی کافی نیستند. درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر پایه توالی ناحیه *ITS*، نشان داد این ژن توانایی کافی در تعیین حدود گونه در این جنس را ندارد. در بررسی‌های پیشین (Samuels *et al.*, 2006; Jaklitsch *et al.*, 2006) نیز نقش ضعیف ناحیه *ITS* در جداسازی گونه‌ها و بررسی‌های تبارزایی گونه‌های *Hypocrea/Trichoderma* مرتبط با تنوع درون‌گونه‌ای زیاد، تنوع بین‌گونه‌ای پایین و جهش‌های درج قطعه‌های کشیده نوکلئوتیدی (long insertion) در بعضی گونه‌ها شناخته شده است. در برابر، درختانی که بر پایه نواحی مختلف ژن *tefla* ترسیم شدند، ضمن گروه‌بندی مناسب‌تر جدایه‌های هرگونه، کلادهای بارز بالتری نسبت به درختان مبتنی بر *ITS* به نمایش گذاشتند. با تمرکز بر ارزش نواحی

ژن و ISTH، استفاده شد (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). گونه *T. capillare* در سال ۲۰۱۲ با استفاده از بررسی‌های تبارزایی از درون گونه *T. saturnisporum* جدا و به‌عنوان گونه مستقل در بخش *Longibrachiatum* قرار گرفت (Samuels et al., 2012). تنها جداییه مربوط به گونه *T. capillare* در این بررسی با استفاده از جستجوی بلاست توالی ناحیه *tefla* و بررسی‌های تبارزایی مبتنی بر آن شناسایی و خوشه‌بندی شد. همچنین تأیید گونه‌های *T. pleurotica* و *T. asperellum* با استفاده از جستجوی بلاست ژن *tefla* و بررسی‌های تبارزایی مبتنی بر ITS و *tefla* انجام شد. Dodd et al. (2003) نیز اذعان کردند شناسایی گونه‌های جنس *Trichoderma* با استفاده از توالی ITS کافی برای جدا کردن همه گونه‌ها نیست.

به‌طور کلی با توجه به همانندی‌های زیاد گونه‌های نزدیک از نظر صفات ظاهری و از سوی دیگر گسترش مفهوم گونه تبارزایی با استفاده از شماری ژن (همچون *tefla*، *rpb2*، β -tubulin، *calmodulin* و *chi18-5*) به‌صورت انفرادی یا چندگانه در بررسی تبارزایی که ارزش طبقه‌بندی دارند و راست نسخه (ارتولوگ) آن‌ها در موجودهای مختلف یافت می‌شوند باعث افزایش گونه‌های قارچی از جمله *Trichoderma* شده است (Druzhinina et al., 2012). نتایج این بررسی نیز با ارائه تبارزایی جداییه‌های بومی از هفت گونه *Trichoderma* با جداییه‌های مرجع و تأیید شده ضمن تأیید اصالت گونه‌های آن‌ها، ضرورت استفاده از توالی چندین ژن را برای تعیین حدود مرز گونه و ارتباط تبارزایی تأیید کرد.

این‌گونه در یک گروه و با اعتبار مناسب قرار نمی‌گیرند (شکل‌های ۱، ۲ و ۳)، که این نتایج با بررسی‌های مولکولی پیشین که به تنوع بالای درون‌گونه‌ای *T. harzianum* اشاره می‌کند، همسان است (Samuels et al., 2002; Naeimi et al., 2010; Chaverri et al., 2003). Naeimi et al. (2010) در بررسی تبارزایی گونه‌های *Trichoderma* جداسازی‌شده از شالیزارهای استان مازندران نشان دادند که جداییه‌های *T. harzianum* به‌عنوان فراوان‌ترین جمعیت و بیشترین تنوع ۱۴ تک‌جور (هاپلوטיפ) مختلف را تشکیل دادند و در پنج گروه تبارزایی قرار گرفتند. Druzhinina et al. (2010) نیز در بررسی‌های تبارزایی این‌گونه به مرکب‌بودن جداییه‌های *H. lixii/T. harzianum* اشاره کرده‌اند. بر پایه گزارش‌های موجود، گونه مرکب *T. harzianum* در بررسی‌های تبارزایی چندژنی به گونه‌های بیشتری جداسازی خواهد شد (Chaverri et al., 2003; Gherbawy et al., 2004; Zhang et al., 2005; Druzhinina et al., 2010; Druzhinina et al., 2010; Kubicek et al., 2003). این تنوع جمعیتی در سطح صفات فنوتیپی نیز مشاهده شده است و غالب بودن جمعیت و تنوع در صفات فنوتیپی جداییه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* از جمله تنوع سوخت‌وسازی (متابولیکی) در زیست‌بوم‌های مختلف تأکید شده است.

به دلیل نبود توالی ITS و توالی هم‌وزن *tefla* برای گونه *T. capillare*، در بررسی تبارزایی از توالی‌های نزدیک‌ترین گونه آن یعنی *T. saturnisporum* در بانک

REFERENCES

1. Ainsworth, G.C. (1971). *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 6th ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 663 pp.
2. Chaverri, P., Castlebury, L.A., Overton, B.E. & Samuels, G.J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 95, 1100-1140.
3. Crouse, J. & Amorese, D. (1987). Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus*, 9, 3-5.
4. Dodd, S., Crowhurst, R.N., Rodrigo, A.G., Samuels, G.J., Hill, R.A. & Stewart, A. (2003). Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, 4, 32-39.
5. Druzhinina, I. & Kubicek, C.P. (2005). Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters. *Journal of Zhejiang University Science Botany*, 6, 100-112.
6. Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G. & Kubicek, C.P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47, 55-64.

7. Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P., Komon-Zelazowska, M., Mulaw, T.B. & Bissett, J. (2010). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 10, 94-94.
8. Druzhinina, I.S., Komon-Zelazowska, M., Ismaiel, A., Jaklitsch, W., Mullaw, T., Samuels, G.J. & Kubicek, C.P. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section Longibrachiatum of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 358-368.
9. Geiser, D.M., Jimenz Gasco, M.M., Kang, S., Mkalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, T.J., Zhang, N., Kuldau, G.A. & O'Donnell, K. (2004). *Fusarium-IDv.1.0*: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110, 473-479.
10. Gherbawy, Y., Druzhinina, I., Shaban, G.M., Wuczkowsky, M., Yaser, M., El-Naghy, M.A., Prillinger, H.J. & Kubicek, C.P. (2004). *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. *Mycological Progress*, 3, 211-218
11. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
12. Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.
13. Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd S.L., Lu, B.S. & Druzhinina, I.S. (2006). *Hypocrea rufa*/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology*, 56, 135-177.
14. Kubicek, C.P., Bissett, J., Kullnig-Gradinger, C.M., Druzhinina, I.S. & Szakacs, G. (2003). Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. *Fungal Genetic and Biology*, 38, 310-317.
15. Kullnig-Gradinger, C., Szakacs, G. & Kubicek, C.P. (2002). Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106, 757-767.
16. Mehrabi-Koushki, M., Rouhani, H. & Farsi, M. (2011). Genetic manipulation of fungal strains for Improvement of heterologous genes expression (a minireview). *African Journal of Biotechnology*, 10(41), 7939-7948.
17. Mehrabi-Koushki, M., Rouhani, H., & Mahdikhani-Moghaddam, E. (2012). Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. *Current Microbiology*, 65, 524-533.
18. Naeimi, S., Khodaparast, S.A., Javan-Nikkhah, M., Vagvolgyi, Cs. & Kredics, L. (2011). Species patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of southern Caspian Sea, Iran. *Cereal Research Communication*, 39, 560-568.
19. Raeder, U. & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20.
20. Samuels, G.J., Dodd, S.L., Gams, W., Castlebury, L.A. & Petrini, O. (2002). *Trichoderma* species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94, 146-170.
21. Samuels, G.J., Dodd, S., Lu, B.S., Petrini, O., Schroers, H.J. & Druzhinina, I. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67-133.
22. Samuels, G.J., Ismaiel, A., Mulaw, T.B., Szakacs, G., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. & Jaklitsch, W.M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55, 77108.
23. Shoukouhi, E. & Bissett, J. (2008). Preferred primers for sequencing the 50 end of the translation elongation factor 1-alpha gene (EF1-a1) and subunit 2 of the RNA polymerase B gene (RPB2). ISTH available from: <http://www.isth.info/methods>.
24. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
25. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315-322
26. Zhang, C.L., Druzhinina, I.S., Kubicek, C.P. & Xu, T. (2005). Biodiversity of *Trichoderma* in China: evidence for a North to South difference of species distribution in East Asia. *FEMS Microbiological Letter*, 251, 251-257.