

مقایسه ناحیه‌های ژنی ITS، D1/D2 LSU rDNA، بتاتوبولین و RNA پلی‌مراز II در جداسازی گونه‌های *Didymella*، *Allophoma* و *Neodidymelliopsis* از خانواده Didymellaceae

مهدی مهربانی کوشکی^{۱*} و رضا فرخی نژاد^۲

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، استان خوزستان، ایران و مرکز

تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، استان خوزستان، ایران

۲. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، استان خوزستان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۷/۱۲)

چکیده

در این پژوهش، ۱۲ سویه بومی و ۸۰ سویه از گونه‌های شناخته‌شده سه جنس *Didymella*، *Allophoma* و *Neodidymelliopsis* گزینش شدند و در یک تجزیه و تحلیل تبارزایی جهت هم‌سنجی ناحیه‌های ژنی ITS، D1 و D2 از زیرواحد بزرگ ژن ریپوزومی (D1/D2) LSU rDNA، بتاتوبولین و RNA پلی‌مراز در جداسازی گونه‌ها استفاده شدند. ناحیه‌های ژنی سویه‌های بومی با به‌کارگیری DNA استخراج‌شده از زیست‌توده میسلیومی خشک‌انجمادی شده تکثیر و توالی‌یابی شدند. تجزیه و تحلیل تبارزایی با به‌کارگیری الگوریتم درست‌نمایی پیشینه انجام شد. ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، *tub2* و *rpb2* به ترتیب ۰، ۲۰، ۴۳ و ۴۶ گونه از ۶۱ گونه مربوط به سه جنس مورد بررسی را جداسازی کردند. در تجزیه و تحلیل تبارزایی ترکیب ناحیه‌های ژنی، همه توالی‌های ترکیبی (*ITS-tub2*، *ITS-rpb2*، *tub2-rpb2*، *ITS-tub2-rpb2* و *ITS-28S-tub2-rpb2*) توانستند، نزدیک به ۴۹ گونه از ۶۱ گونه مورد بررسی را جدا کنند. نتیجه‌ها نشان دادند که برای شناسایی و جداسازی دقیق گونه‌های *Didymella*، *Allophoma* و *Neodidymelliopsis*، توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل تبارزایی سه ناحیه ITS، *tub2* و *rpb2* در کنار بررسی‌های ریخت‌شناسی نیازم است. چنانچه به خاطر محدودیت‌های مالی یا زمانی در یک پژوهش، تنها تکثیر و توالی‌یابی یک ناحیه دلخواه باشد، ژن *tub2* یا *rpb2* بهترین نتایج را ارائه می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه و تحلیل تبارزایی، شناسایی گونه، فیلوژنی تک‌ژنی و چندژنی.

A comparison between ITS, D1/D2 LSU rDNA, tub2, and rpb2 regions to delimit *Allophoma*, *Didymella*, and *Neodidymelliopsis* species from the family Didymellaceae

Mehdi Mehrabi-Koushki^{1*} and Reza Farokhinejad²

1. Assistant Professor of Plant Pathology, Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan Province, Iran and Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Professor of Plant Pathology, Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan Province, Iran

(Received: Apr. 10, 2018 - Accepted: Oct. 4, 2018)

ABSTRACT

In this study, 12 native strains and 80 strains from the known species of *Allophoma*, *Didymella*, and *Neodidymelliopsis* were selected. The ITS, D1/D2 LSU rDNA, *tub2* and *rpb2* regions of the mentioned strains were compared for species delimitation using phylogenetic analysis. The genomic regions of the native strains were amplified using DNA extracted from freeze-dried mycelia and sequenced. The phylogenetic analysis was performed using the maximum likelihood algorithm. The regions of the D1/D2 LSU rDNA, ITS, *tub2*, and *rpb2* delimited 0, 20, 43, and 46 out of 61 species studied, respectively. In the phylogenetic analysis based on combined regions, all datasets (*ITS-tub2*, *ITS-rpb2*, *tub2-rpb2*, *ITS-tub2-rpb2*, and *ITS-28S-tub2-rpb2*) could delimit 49 out of the 61 species under survey. Results showed that the sequencing and phylogenetic analysis of the ITS, *tub2*, and *rpb2* regions in combination with morphological studies are necessary for species delimitation of the *Allophoma*, *Didymella* and *Neodidymelliopsis* genera. In a single-locus phylogeny, *tub2* or *rpb2* genes are the best markers among the genomic regions used.

Keywords: Phylogenetic analysis, species identification, single-gene and multigene phylogeny.

* Corresponding author E-mail: mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com

Didymella, Ectophoma, Epicoccum
 Heterophoma, Juxtiphoma, Leptosphaerulina
 Macroventuria, Neoascochyta, Neodidymelliopsis
 Neomicrosphaeropsis, Nothophoma
 Paraboeremia, Phoma, Phomatodes
 Pseudoascochyta, Remotididymella, Similiphoma
 Stagonosporopsis, Vacuiphoma و Xenodidymella
 در این خانواده قرار گرفته است.

امروزه شناسایی گونه‌های قارچی بدون تجزیه و تحلیل تبارزایی بر پایه ناحیه‌های ژنی تک یا ترکیبی، بی‌ارزش است و با توجه به اینکه شاید در بسیاری از پژوهش‌ها از دید مالی یا هزینه کردن زمان امکان تکثیر چندین ناحیه ژنی جود نداشته باشد، این پژوهش نقش ناحیه‌های ژنی ITS, D1/D2 LSU rDNA, بتاتوبولین و RNA پلی‌مراز را در جداسازی گونه‌های *Didymella*, *Allophoma* و *Neodidymelliopsis* با وارد کردن جدایه‌های بومی ایران از سه گونه بررسی می‌کند.

مواد و روش‌ها

سویه‌های بومی گزینشی از سه جنس مورد بررسی در این بررسی، ۱۲ سویه بومی متعلق به سه گونه *Allophoma hayatii* (سویه‌های CBS 142859 و CBS 142860)، *Didymella microchlamyospora* (سویه‌های CBS 142855، CBS 142856، CBS 142858 و IRAN 2790C) و *Neodidymelliopsis farokhinejadii* (سویه‌های CBS 142848، CBS 142849، CBS 142850، CBS 142851، CBS 142852 و CBS 142853) از مجموعه قارچ‌های زنده گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز گزینش شدند. این سویه‌ها از مناطق گوناگون استان خوزستان جداسازی و شناسایی شده بودند (Ahmadpour *et al.*, 2017a, b; Babaahmadi *et al.*, 2018).

تولید زیست‌توده میسلیومی و استخراج DNA از کناره جوان در حال رشد پرگنه هر کدام از سویه‌های گزینشی، چهار دیسک با به‌کارگیری چوب‌پنبه سوراخ‌کن برداشت و جداگانه به فلاسک‌های ارلن‌مایر دربرگیرنده محیط کشت مایع سیب‌زمینی-

مقدمه

خانواده Didymellaceae جزء شاخه قارچ‌های رشته‌ای Ascomycota، زیرشاخه Pezizomycotina، رده Dothideomycetes، زیررده Pleosporomycetidae و راسته Pleosporales است (de Gruyter *et al.*, 2009). این خانواده در سال ۲۰۰۹ برای جای دادن جنس‌های *Ascochyta*، *Didymella*، *Phoma* و هم‌چنین چندین جنس دیگر همانند *Phoma* بنا نهاده شد (de Gruyter *et al.*, 2009). بررسی تاریخچه طبقه‌بندی قارچ‌ها بر پایه ریخت‌شناسی نشان می‌دهد که اعضای در پیوند با جنس *Phoma* همانند بسیاری از قارچ‌های دیگر ابهامات فراوانی داشته‌اند و این بیشتر در پیوند با همگرایی^۱ در صفات ریخت‌شناسی و تجربیات گوناگون آرایه‌شناسان (تاکسونومیست‌ها) در دست یافتن این به صفات بوده است (Chen *et al.*, 2015). به‌کارگیری توالی نوکلئوتیدی چندین ناحیه ژنی و تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی در پیوند با آن، دگرگونی‌های گسترده‌ای در جایگاه طبقه‌بندی و شمار گونه‌های قارچ‌های همانند *Phoma* (de Gruyter *et al.*, 2009, 2010, 2012; Aveskamp *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2015; Ariyawansa *et al.*, 2015; Hyde *et al.*, 2016) و دیگر جمعیت‌های قارچی از جمله *Trichoderma* (Druzhinina *et al.*, 2010)، *Fusarium* (Short *et al.*, 2013; Laurence *et al.*, 2014)، *Alternaria* (Woudenberg *et al.*, 2013)، *Bipolaris* (Manamgoda *et al.*, 2012) و *Colletotrichum* (Cannon *et al.*, 2012) (Jayawardena *et al.*, 2016) و *Phyllosticta* (Wikee *et al.*, 2011; Hyde *et al.*, 2014) ایجاد کرده است. خانواده Didymellaceae نیز با به‌کارگیری تجزیه و تحلیل تبارزایی بر پایه ناحیه‌های ژنی ITS, D1/D2 LSU rDNA (28S)، بتاتوبولین (tub2) و RNA پلی‌مراز II (rpb2) بررسی شد (Chen *et al.*, 2015, 2017; Ariyawansa *et al.*, 2015; Hyde *et al.*, 2016; Valenzuela-Lopez *et al.*, 2018) و بر پایه آن، جنس‌های *Ascochyta*، *Allophoma*، *Boeremia*، *Cumuliphoma*، *Calophoma*، *Briansuttonomyces*

1. Homoplasy

GenBio، کره جنوبی)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و آب مقطر دوبار تقطیر شده تا حجم ۵۰ میکرولیتر آماده و در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler) قرار گرفت. برنامه دمایی و زمانی ترموسیکلر برای هر جفت آغازگر به شرح زیر انجام شد:

| مدت زمان (ثانیه) | دما (°C) | شمار چرخه | نوع تیمار |
|------------------|--|-----------|--------------------|
| ۳۰۰ | ۹۴ | ۱ | واسرشت‌سازی نخستین |
| ۳۰ | ۹۴ | ۳۵ | چرخه‌های اصلی |
| ۳۰ | ۵۷ به هم پیوستن | | |
| ۳۰ | جفت آغازگرهای RPB2- و ITS1/NL4 5F2/fRPB2-7cR | | |
| | ۵۸ به هم پیوستن | | |
| | جفت آغازگر Btub2Fd/ Btub4Rd | | |
| ۹۰ | ۷۲ گسترش برای ناحیه ریبوزومی (تکثیر توأمان D1/D2 و ITS (LSU rDNA | | |
| ۶۰ | ۷۲ گسترش برای ناحیه tub2 و rpb2 | | |
| ۳۰۰ | ۷۲ | ۱ | گسترش پایانی |

تمیز کردن قطعه‌های تکثیری و توالی‌یابی

بیشتر تولیدات تکثیری به روش ته‌نشینی با اتانول تغلیظ و شستشو شدند (Crouse & Amorese, 1987). برای نمونه‌هایی که نوار اضافه دیده شد، قطعه‌های تکثیری هدف از ژل جدا و با به‌کارگیری کیت استخراج از ژل GF-1 AmbiClean Kit (Vivantis، مالزی) برابر با دستورکار سازنده خالص‌سازی شد. توالی‌یابی با به‌کارگیری آغازگرهای روبه‌جلو و وارونه به‌وسیله شرکت ماکروژن (Humanizing Genomics, Macrogen, South Korea) انجام شد.

تجزیه و تحلیل تبارزایی برای آشکار ساختن ارزش هر کدام از چهار ناحیه توالی‌یابی شده برای جداسازی گونه‌ها

افزون بر توالی‌های به‌دست‌آمده در این پژوهش، توالی‌های نوکلئوتیدی ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 وابسته به سویه‌های تیپ یا سرشناس از

دکستروز- بروث (PDB) مایه‌زنی شد و درون شیکرانکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و سرعت ۱۲۰ تکان در دقیقه برای زمانی برابر ۱۰ روز نگهداری شدند. زیست‌توده میسیلیومی با زدودن قطعه‌های آگار و شستشو روی کاغذ صافی جمع‌آوری گردید. جهت نگهداری تا هنگام استخراج DNA، زیست‌توده در لوله‌های فالکن ۵۰ میلی‌لیتری بسته‌شده با گاز سترون در دستگاه فریزدرایر (Freeze Dryer, Alpha 1-2 LDplus, Christ) خشک-انجماد شدند و سپس درون ازلت مایع پودر گردیدند. این پودر تا زمان استخراج DNA، در لوله‌های فالکن مسدودشده در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. جداسازی DNA به روش Raeder & Broda (1985) با اندکی دگرگونی انجام گرفت (Ahmadpour et al., 2017a).

تکثیر ناحیه‌های ژنی ITS، D1/D2 LSU rDNA، بتاتوبولین و RNA پلی‌مراز

برای تکثیر نزدیک به ۱۲۰۰ جفت باز از ناحیه ITS و D1/D2 LSU rDNA از ژن nrRNA از جفت آغازگر عمومی ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و NL4-R (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') استفاده شد (White et al., 1990; O'Donnell 1993). جهت تکثیر نزدیک به ۴۵۰bp از ژن بتاتوبولین از جفت آغازگر اختصاصی Btub2Fd (5'-GTBCACCTYCARACCGGYCARTG-3') و Btub4Rd (CCR GAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC) استفاده شد (Woudenberg et al., 2009). همچنین برای تکثیر نزدیک به ۹۰۰ bp از ناحیه RNA پلی‌مراز، از جفت آغازگر اختصاصی RPB2-5F2 (5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') و fRPB2-7cR (5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3') استفاده شد (Sung et al., 2007; Liu et al., 1999). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با به‌کارگیری پنج میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، غلظت نهائی ۲-۳ میلی‌مولار از MgCl₂، دو میکرولیتر آغازگر روبه‌جلو (10µm)، دو میکرولیتر آغازگر وارونه (10µm)، دو میکرولیتر از مخلوط (2.5mm each) dNTP، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/µl)

و ۷۷ درصد همانندی نوکلئوتیدی، ۵، ۲، ۱۲/۵ و ۲۳ درصد چندشکلی نوکلئوتیدی^۲ و ۰، ۰، ۰ درصد پاک کردن و جای دادن نوکلئوتیدی^۳ دارند. گونه‌های شناخته‌شده *Didymella*، در ناحیه‌های ITS، 28S، tub2 و rpb2 (۴۱۳، ۴۹۹، ۲۸۳ و ۵۹۶ نوکلئوتید موردبررسی) به ترتیب ۸۹، ۹۶، ۶۲/۵ و ۵۷ درصد همانندی نوکلئوتیدی، ۸، ۴، ۳۵ و ۴۳ درصد چندشکلی نوکلئوتیدی و ۳، ۰، ۲/۵ و ۰ درصد پاک کردن و جای دادن نوکلئوتیدی دارند. گونه‌های شناخته‌شده *Neodidymelliopsis*، در ناحیه‌های ITS، 28S، tub2 و rpb2 (۴۰۹، ۴۹۹، ۲۸۰ و ۵۹۶ نوکلئوتید موردبررسی) به ترتیب ۹۷/۵، ۹۹، ۸۶ و ۸۷ درصد همانندی نوکلئوتیدی و ۲/۵، ۱، ۱۴ و ۱۳ درصد چندشکلی نوکلئوتیدی دارند.

در این بررسی، ۳۶۸ توالی از ۹۲ آرایه (با در نظر گرفتن آرایه خارج از گروه) در تجزیه و تحلیل تبارزایی با به کارگیری الگوریتم درست‌نمایی بیشینه به صورت تک‌ژنی و ترکیب چندژنی استفاده شدند (شکل‌های ۱ تا ۷). در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه، خوشه‌بندی آرایه‌ها در درختان تک‌ژنی (به‌غیر از D1/D2 LSU rDNA) و چندژنی کمابیش یکسان بود که نشان‌دهنده سازگاری میان توالی‌های هر ناحیه و امکان استفاده آن‌ها به صورت ترکیبی بود. مجموع طول توالی ترکیبی هم‌ردیف‌سازی شده چهار ناحیه موردبررسی با به شمار آوردن سایت‌های پاک کردن و جای دادن نوکلئوتیدی^۴، ۱۸۲۴ سایت نوکلئوتیدی (درب‌گیرنده^۵ ۴۲۹، ۵۰۳، ۲۸۹ و ۶۰۳ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه‌های ITS، D1/D2، LSU rDNA، tub2 و rpb2) بود. از این شمار سایت نوکلئوتیدی با پاک کردن آرایه خارج از گروه، ۱۳۱۸ سایت محافظت‌شده (درب‌گیرنده^۵ ۳۵۶، ۴۷۱، ۱۷۵ و ۳۱۶ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2)، ۹۹ سایت متغیر و عاری از داده‌های متمایزکننده آرایه‌ها^۵ (درب‌گیرنده^۵ ۱۸، ۸، ۱۸ و ۵۵ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از

همه گونه‌های شناخته‌شده سه جنس *Allophoma*، *Didymella* و *Neodidymelliopsis* از خانواده Didymellaceae از بانک ژن NCBI گزینش شدند. برای گونه‌هایی که توالی چهار ناحیه مورد هم سنجی برای بیش از یک سویه در بانک ژن وجود داشت، دو سویه گزینش شد. یک سویه (CBS 523.66) از گونه *Pleospora betae* به‌عنوان آرایه بیرون از گروه (Outgroup) جهت ریشه‌دار کردن درختان تبارزایی استفاده شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با به کارگیری نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 (Hall, 1999) ویرایش شدند. خوانش‌های مستقیم و وارونه هر ژن برای هر جدایه با به کارگیری نرم‌افزار DNA Baser Sequence Assembler v4 مونتاژ شدند. تجزیه و تحلیل تبارزایی و نگاشتن درختان ژنی بر پایه توالی ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 به صورت جداگانه و ترکیب چهار ناحیه (فیلوژنی بر پایه چند جایگاه کروموزومی) با به کارگیری الگوریتم درست‌نمایی بیشینه^۱ و آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ بار تکرار با یاری نرم‌افزار MEGA 6 انجام شد (Tamura et al., 2013). ارزیابی بهترین الگو جانیشینی نوکلئوتیدی در نگاشتن درختان تبارزایی برای هر گروه توالی با به کارگیری همین نرم‌افزار انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل ناحیه‌های ژنی مورد استفاده در فیلوژنی توالی‌های تولیدشده تحت شماره‌های دسترسی KX139011 تا KX139018، KX139028 تا KX821242، KY449008 تا KY449017، KY449018 تا KY449023، KY464919 تا KY684812، KY684817 تا MF095108 و MF095109 در بانک ژن ذخیره شده‌اند. تجزیه و تحلیل ناحیه‌های ژنی نشان داد که گونه‌های شناخته‌شده *Allophoma*، در ناحیه‌های ITS، 28S، tub2 و rpb2 (۴۱۵، ۴۹۹، ۲۸۰ و ۵۹۶ نوکلئوتید موردبررسی) به ترتیب ۹۳، ۹۸، ۸۷/۵ و

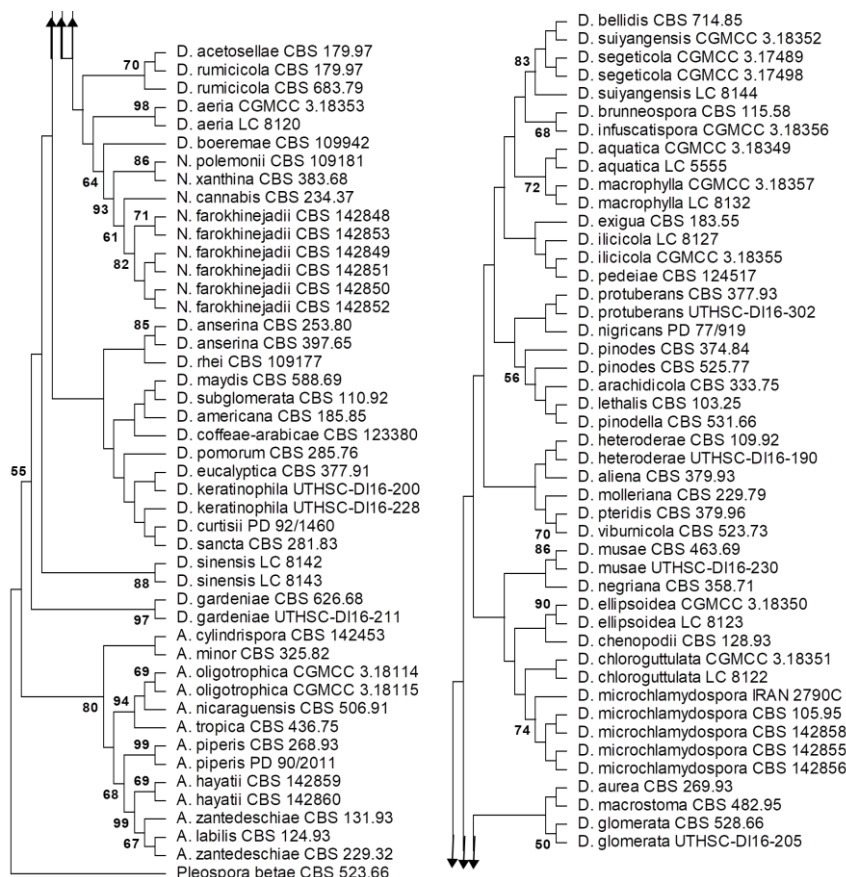
2. Single nucleotide polymorphisms
3. deletion/insertion
4. Gaps
5. Parsimony-uninformative

1. Maximum likelihood

ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2) و ۳۸۰ سایت متغیر و دربرگیرنده داده‌های متمایزکننده آرایه‌ها^۱ (شامل ۴۵، ۲۰، ۹۰ و ۲۲۵ سایت نوکلئوتیدی به ترتیب از ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA و tub2 و rpb2) بود.

جداسازی گونه‌ها بر پایه یکی از ناحیه‌های ژنی در درخت تبارزایی بر پایه ناحیه D1/D2 LSU rDNA (نشان داده نشده)، هیچ‌کدام از گونه‌های سه جنس مورد بررسی از همدیگر جداسازی نشدند. در درخت تبارزایی بر پایه ناحیه ITS (شکل ۱)، دو سویه مربوط به گونه‌های *D. aerea*، *A. piperis*، *D. gardeniae*، *D. ellipsoidea*، *D. anserina*، *D. molleriana*، *D. microchlamydospora*، *D. pteridis*، *D. pomorum*، *D. negriana*، *D. musae* و *D. sinensis* از دیگر گونه‌ها جداسازی شدند.

جداسازی گونه‌ها بر پایه یکی از ناحیه‌های ژنی در درخت تبارزایی بر پایه ناحیه D1/D2 LSU rDNA (نشان داده نشده)، هیچ‌کدام از گونه‌های سه جنس مورد بررسی از همدیگر جداسازی نشدند. در درخت تبارزایی بر پایه ناحیه ITS (شکل ۱)، دو سویه مربوط به گونه‌های *D. aerea*، *A. piperis*، *D. gardeniae*، *D. ellipsoidea*، *D. anserina*، *D. molleriana*، *D. microchlamydospora*، *D. pteridis*، *D. pomorum*، *D. negriana*، *D. musae* و *D. sinensis* از دیگر گونه‌ها جداسازی شدند.

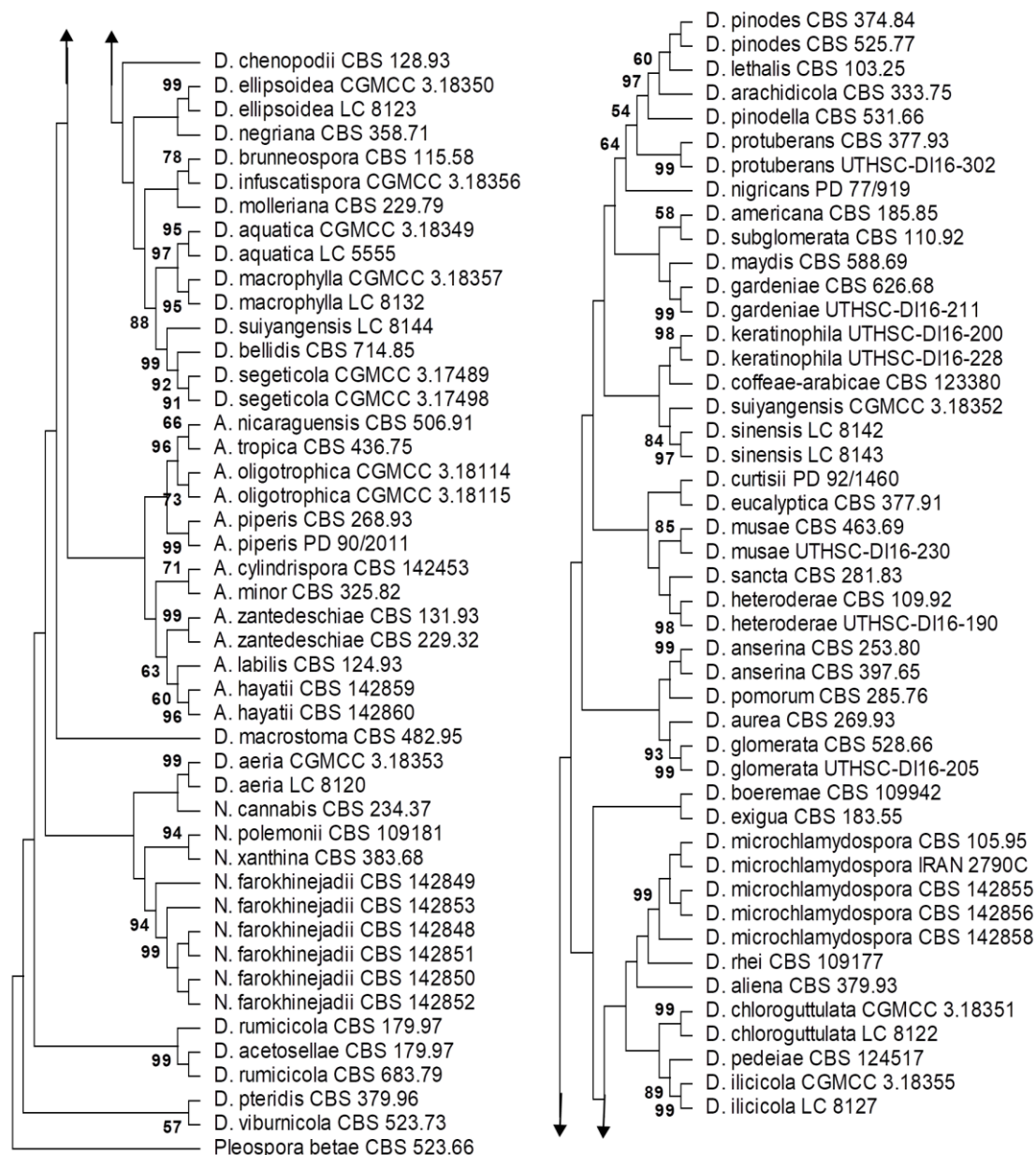


شکل ۱. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی ITS با به‌کارگیری مدل K2+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 1. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of ITS sequences using the K2+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.

و *N. polemonii*، *D. sinensis*، *D. rumicicola* از دیگر گونه‌ها جداسازی نشدند. در دو درخت بر پایه ناحیه‌های *tub2* و *rpb2* (شکل‌های ۲ و ۳)، دو سویه مربوط به گونه‌های موردبررسی بیشتر کلادهایی با اعتبار ۹۹ درصد ایجاد کردند.

در درخت تبارزایشی بر پایه ناحیه *rpb2* (شکل ۳)، گونه‌های *A. tropica*، *A. nicaraguensis*، *D. americana*، *D. aerea*، *D. acetosellae*، *D. brunneospora*، *D. bellidis*، *D. arachidicola*، *D. lethalis*، *D. infuscatispora*، *D. chenopodii*، *D. pinodes*، *D. pinodella*، *D. maydis*



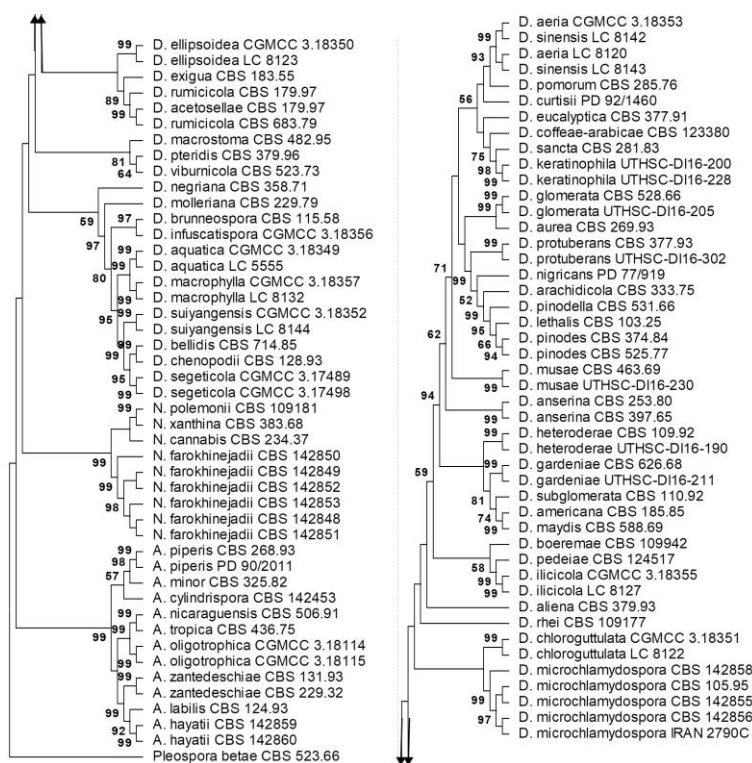
شکل ۲. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های موردبررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی *tub2* با به‌کارگیری مدل K2+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 2. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of *tub2* sequences using the K2+G+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.

(شکل ۴) از دیگر گونه‌ها جداسازی شدند ولی در درختان تبارزایشی بر پایه توالی ترکیبی ITS-rpb2 (شکل ۵)، tub2-rpb2 (شکل ۶)، ITS-tub2-rpb2 (نشان داده نشده) و ITS-28S-tub2-rpb2 (شکل ۷) جداسازی نشدند. برعکس، گونه‌های *D. aquatica*، *D. macrophylla*، *D. exigua*، *D. bellidis* و *D. segeticola* در درختان تبارزایشی بر پایه توالی ترکیبی ITS-rpb2، tub2-rpb2، ITS-tub2-rpb2 و ITS-28S-tub2-rpb2 از دیگر گونه‌ها جداسازی شدند (شکل‌های ۵ تا ۷) ولی در درخت تبارزایشی بر پایه توالی ترکیبی ITS-tub2 (شکل ۴) جدا نشدند. دو سویه نماینده گونه *D. suiyangensis* (CGMCC 3.18352 و LC 8144) مورد استفاده در تجزیه و تحلیل تبارزایشی در همه درختان تبارزایشی بر پایه ناحیه‌های ترکیبی و rpb2 از دیگر گونه‌ها جدا شدند ولی به‌غیر از فیلوگرام‌های بر پایه ترکیب توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه‌های ITS-rpb2 و rpb2 کلادهای با عدد اعتبارسنجی کافی ایجاد نکردند.

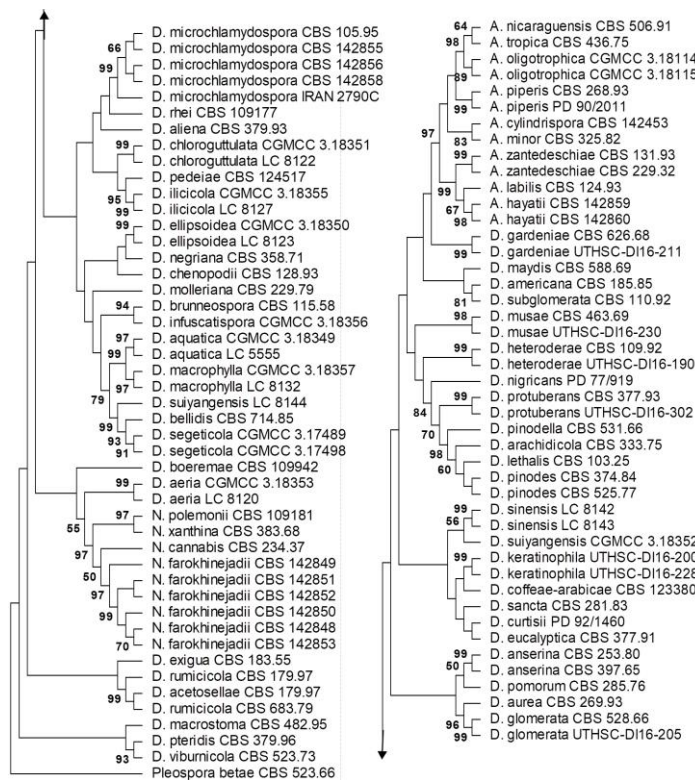
جداسازی گونه‌ها بر پایه ترکیب ناحیه‌های ژنی

درختان ترسیم‌شده بر پایه ترکیب ناحیه‌های ITS-tub2 (شکل ۴)، ITS-rpb2 (شکل ۵)، tub2-rpb2 (شکل ۶)، ITS-tub2-rpb2 (نشان داده نشده) و ITS-28S-tub2-rpb2 (شکل ۷)، خوشه‌بندی کم‌وبیش یکسانی را نشان دادند ولی ارزش این ناحیه‌های ترکیبی در جداسازی برخی گونه‌ها گوناگون بود. بیشتر گونه‌های سه جنس مورد بررسی در هر پنج درخت تبارزایشی بر پایه ناحیه‌های ترکیبی از همدیگر جداسازی شدند و گونه‌هایی که دارای دو سویه نماینده در تجزیه و تحلیل تبارزایشی بودند، کلادهای بالارزش بالای ۹۹ درصد ایجاد کردند. گونه‌های *D. arachidicola*، *D. acetosellae*، *D. lethalis*، *D. pinodes* و *D. pinodella* هیچ‌کدام از درختان تبارزایشی بر پایه ناحیه‌های ترکیبی از دیگر گونه‌ها جدا نشدند. گونه‌های *D. brunneospora*، *A. tropica*، *A. nicaraguensis* در *N. xanthina* و *N. polemonii*، *D. infuscatispora* در درخت تبارزایشی بر پایه توالی ترکیبی ITS-tub2



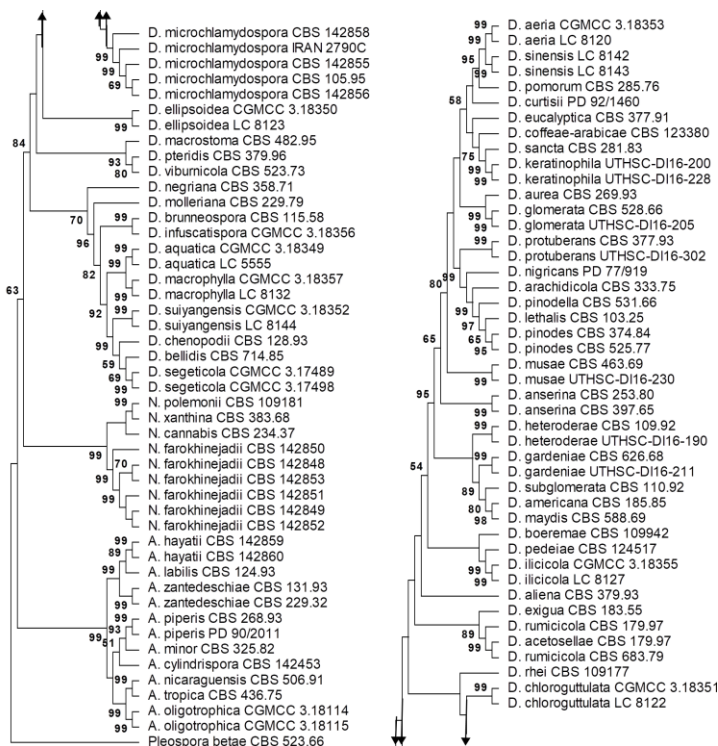
شکل ۳. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی rpb2 با به‌کارگیری مدل GTR+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 3. The scale-free phylogenetic tree of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of rpb2 sequences using the GTR+G+I model. Bootstrap values less than 50 are not shown.



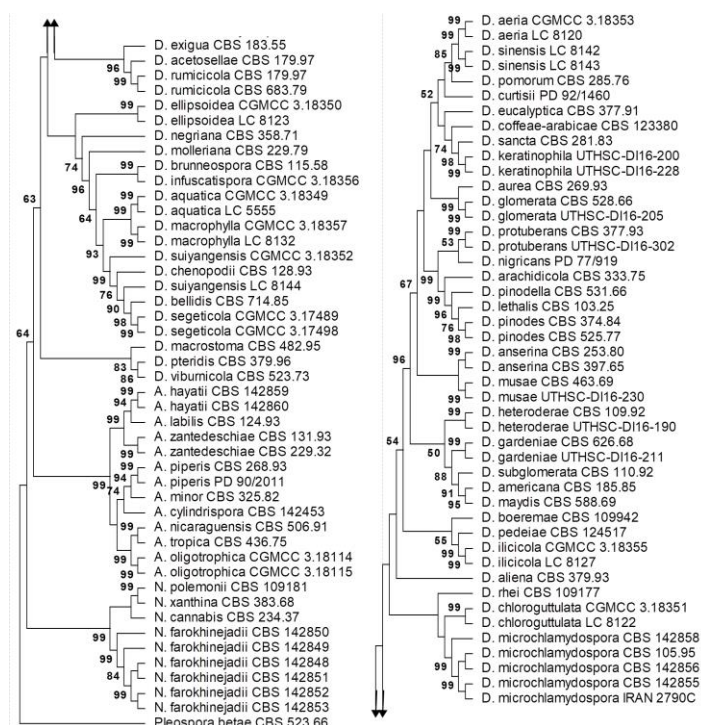
شکل ۴. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی ترکیبی ITS-tub2 با به‌کارگیری مدل TN93+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 4. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of ITS-tub2 combined sequences using the TN93+G+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.



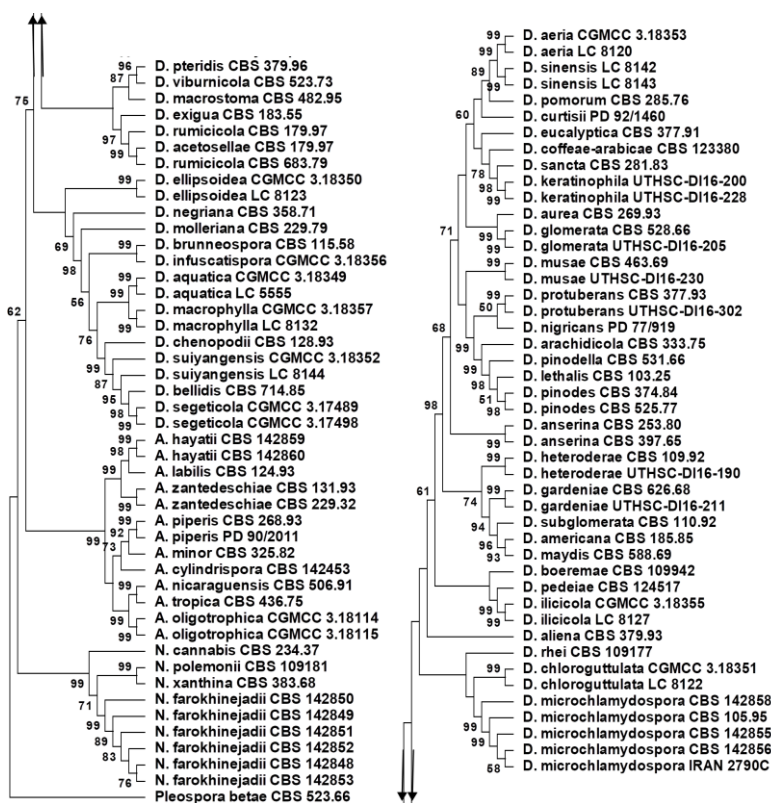
شکل ۵. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی ترکیبی ITS-rpb2 با به‌کارگیری مدل TN93+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 5. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of ITS-rpb2 combined sequences using the TN93+G+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.



شکل ۶. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی ترکیبی tub2-rpb2 با به کارگیری مدل GTR+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده‌اند.

Figure 6. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of tub2-rpb2 combined sequences using the GTR+G+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.



شکل ۷. فیلوگرام بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر پایه توالی ترکیبی ITS-28S-tub2-rpb2 با به کارگیری مدل GTR+G+I به دست آمد. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ نشان داده نشده‌اند.

Figure 7. The scale-free phylogram of species under survey constructed through maximum likelihood analysis of ITS-28S-tub2-rpb2 combined sequences using the GTR+G+I model. Bootstrap values less than 50% are not shown.

بحث

شوند. در جداسازی این گونه‌های خویشاوند، بررسی ریخت‌شناسی می‌تواند به پژوهشگر در شناسایی پایانی یاری کند. از جمله صفات ریخت‌شناسی که در جداسازی گونه‌های بسیار نزدیک تبارزایی استفاده شده است، می‌توان به اندازه پیکنیدیوم‌ها و کنیدی‌ها، داشتن پاپیل و گردن پیکنید، شمار و اندازه آن، شمار استیول، شمار لایه سلولی دیواره پیکنیدیوم، اندازه و شکل سلول‌های کنیدی‌زائی در درون پیکنیدیوم، وجود یا نبود ریشه‌های قارچ چسبیده به دیواره برونی پیکنیدیوم، شمار حجره‌ها و قطرات چربی در کنیدی‌ها، بودن سلول‌های برآمده و کل‌امیدسپورها اشاره کرد. نتیجه‌های خوشه‌بندی و جداسازی گونه‌های سه جنس مورد بررسی ارائه شده بر پایه تجزیه و تحلیل تبارزایی توالی ترکیبی چهار ناحیه ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 در این پژوهش با پژوهش‌های انجام شده در سال‌های پسین هم‌خوانی دارد (Chen et al., 2015, 2017; Valenzuela-Lopez et al., 2018).

در تجزیه و تحلیل ۴۲۹، ۵۰۳، ۲۸۹ و ۶۰۳ سایت نوکلئوتیدی از ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 هم‌ردیف‌سازی شده^۱ و مورد استفاده در نگاشتن درختان تبارزایی در این پژوهش، نشان داده شد که به ترتیب ۴، ۱۰، ۳۱ و ۳۷ درصد سایت‌ها دربرگیرنده داده‌های متمایزکننده آرایه‌ها هستند و بیشترین نقش را در این خوشه‌بندی تبارزایی دارند. این بررسی نشان داد که دو ناحیه tub2 و rpb2 که بیشترین سایت‌های دربرگیرنده داده‌های متمایزکننده آرایه‌ها را دارند، بیشترین نقش را در جداسازی گونه‌ها نیز دارند. در مجموع می‌توان گفت، برای شناسایی و جداسازی دقیق گونه‌های *Didymella Allophoma* و *Neodidymelliopsis* توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل تبارزایی سه ناحیه ITS، tub2 و rpb2 در کنار بررسی‌های ریخت‌شناسی ناگزیر به نظر می‌رسد. ولی با توجه به محدودیت مالی یا زمانی برخی پروژه‌های پژوهشی، چنانچه تنها تکثیر و توالی‌یابی یک ناحیه مدنظر باشد، ژن tub2 و چنانچه تکثیر و توالی‌یابی دو ناحیه شُدنی باشد، دوژن tub2 و rpb2 بهترین نتیجه‌ها را ارائه می‌کنند.

پژوهش‌های شناسایی جمعیت‌های قارچی در سال‌های پسین نشان می‌دهند که معتبرترین راه جداسازی گونه‌ها، تجزیه و تحلیل تبارزایی بر پایه ترکیب توالی نوکلئوتیدی چندین ژن خانه‌دار (ترجیحاً چند ناحیه ژنی غیر پیوسته) است (de Gruyter et al., 2009, 2010, 2012; Aveskamp et al., 2010; Druzhinina et al., 2010; Wikee et al., 2011; Cannon et al., 2012; Manamgoda et al., 2012; Short et al., 2013; Woudenberg et al., 2013; Hyde et al., 2014; Laurence et al., 2014; Chen et al., 2015, 2017; Ariyawansa et al., 2015; Hyde et al., 2016; Jayawardena et al., 2016; Valenzuela-Lopez et al., 2018). بر این پایه در این بررسی از چهار ناحیه ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 به صورت آزادانه و ترکیبی جهت هم‌سنجی جداسازی گونه‌های سه جنس *Didymella Allophoma* و *Neodidymelliopsis* از خانواده Didymellaceae استفاده شده است. خوشه‌بندی و توپولوژی ارائه شده در درختان تبارزایی نگاشتنی (شکل‌های ۱ تا ۳) نشان می‌دهند که ناحیه‌های ITS، D1/D2 LSU rDNA، tub2 و rpb2 به ترتیب ۰، ۲۰، ۴۳ و ۴۶ گونه از ۶۱ گونه مربوط به سه جنس مورد بررسی را از دیگر گونه‌ها جداسازی می‌کنند و این جداسازی بر پایه ناحیه ITS با ایجاد کلادهای با اعتبار کمتر (ارزش کلاد پایین‌تر) است. از این روی می‌توان گفت در یک تجزیه و تحلیل تبارزایی تک‌ژنی بر پایه هر کدام از دو ناحیه tub2 و rpb2 می‌توان تا دو سوم گونه‌های شناخته شده این قارچ‌ها را جداسازی و شناسایی کرد اگرچه این جداسازی (بر پایه یک ناحیه ژنی) باید در هم‌خوانی با نتیجه‌های بررسی ریخت‌شناسی نیز داشته باشد. در تجزیه و تحلیل تبارزایی ترکیب ناحیه‌های ژنی (شکل‌های ۴ تا ۷)، همه توالی‌های ترکیبی (ITS-tub2، ITS-rpb2، ITS-tub2-rpb2 و ITS-28S-tub2-rpb2) توانستند نزدیک به ۴۹ گونه از ۶۱ گونه مربوط به سه جنس مورد بررسی را جدا کنند. باقی‌مانده گونه‌ها نیز از دیگر گونه‌های دور جداسازی شدند ولی نتوانستند از یک یا چند گونه نزدیک خود (گونه خویشاوند) جداسازی معتبر تبارزایی

REFERENCES

- Ahmadpour, S. A., Mehrabi-Koushki, M. & Farokhinejad, R. (2017a). *Neodidymelliopsis farokhinejadii* sp. nov., an undescribed fungus from dead branches of trees in Iran. *Sydowia*, 69, 171-182.
- Ahmadpour, S. A., Farokhinejad, R. & Mehrabi-Koushki, M. (2017b). Further characterization and pathogenicity of *Didymella microchlamydospora* causing stem necrosis of *Morus nigra* in Iran. *Mycosphere*, 8(7), 835-852.
- Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Jayasiri, S. C., Buyck, B., Chethana, K. T., Dai, D. Q., Dai, Y. C., Daranagama, D. A., Jayawardena, R. S., Lücking, R. & Ghobad-Nejhad, M. (2015). Fungal diversity notes 111-252-taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 75, 27-274.
- Aveskamp, M., de Gruyter, J., Woudenberg, J., Verkley, G. & Crous, P. W. (2010). Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60.
- Babaahmadi, G., Mehrabi-Koushki, M. & Hayati J. (2017). *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress*, 17(3), 365-379.
- Cannon, P. f., Damm, U., Johnston, P. R. & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181-213.
- Chen, Q., Jiang, J. R., Zhang, G. Z., Cai, L. & Crous, P. W. (2015). Resolving the *Phoma* enigma. *Studies in Mycology*, 82, 137-217.
- Chen, Q., Hou, L. W., Duan, W. J., Crous, P. W. & Cai, L. (2017). Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, 87, 105-159.
- Crouse, J. & Amorese, D. (1987). Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus*, 9, 3-5.
- de Gruyter, J., Aveskamp, M. M., Woudenberg, J. H., Verkley, G. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2009). Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research*, 113, 508-519.
- de Gruyter, J., Woudenberg, J. H., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2010). Systematic reappraisal of species in *Phoma* section *Paraphoma*, *Pyrenochaeta* and *Pleurophoma*. *Mycologia*, 102, 1066-1081.
- De Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Aveskamp, M. M., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2013). Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in Pleosporales. *Studies in Mycology*, 75, 1-36.
- Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P., Komon-Zelazowska, M., Belayneh-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, 94-96.
- 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.
- Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., de Cock, A. W., Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D. & Gorczak, M. (2014). One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67(1), 21-125.
- Hyde, K. D., Hongsanan, S., Jeewon, R., Bhat, D. J., McKenzie, E. H. C., et al. (2016). Fungal Diversity. Notes 367–490: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity*, 80, 1-270.
- Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Damm, U., Cai, L., Liu, M., Li, X. H., Zhang, W., Zhao, W. S. & Yan, J. Y. (2016). Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. *Mycosphere*, 7, 1192-1260
- Laurence, H. M., Summerell, B. A., Burgess, L. W. & Liew, E. C. Y. (2014). Genealogical concordance phylogenetic species recognition in the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Biology*, 118, 374-384.
- Liu, Y. J., Whelen, S. & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among *Ascomycetes*: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1799-1808.
- Manamgoda, D. S., Cai, L., McKenzie, E. H. C., Crous, P. W., Madrid, H., Chukeatirote, E., Shivas, R. G., Tan, Y. P. & Hyde, K. D. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* – *Cochliobolus* – *Curvularia* complex. *Fungal Diversity*, 56, 131-144.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and ITS near relatives. In: Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (eds), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. UK: CAB International, pp. 225-233.
- Raeder, U. & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20

23. Short, D. P. G., O'Donnell, K., Thrane, U., Nielsen, K. F., Zhang, N., Juba, J. H. & Geiser, D. M. (2013). Phylogenetic relationships among members of the *Fusarium solani* species complex in human infections and the descriptions of *F. keratoplasticum* sp. nov. and *F. petroliphilum* stat. nov. *Fungal Genetics and Biology*, 53, 59-70.
24. Sung, G. H., Sung, J. M., Hywel-Jones, N. L. & Spatafora, J. W. (2007). A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 1204-1223.
25. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
26. Valenzuela-Lopez, N., Cano-Lira, J. F., Guarro, J., Sutton, D. A., Wiederhold, N., Crous, P. W. & Stehligel, A. M. (2018). Coelomycetous *Dothideomycetes* with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. *Studies in Mycology*, 90, 1-69.
27. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds). *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, USA, pp. 315-322.
28. Wikee, S., Udayanga, D., Crous, P. W., Chukeatirote, E., McKenzie, E. H. C., Bahkali, A. H., Dai, D. Q. & Hyde, K. D. (2011). *Phyllosticta* an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity*, 51, 43-61.
29. Woudenberg, J., Aveskamp, M., de Gruyter, J., Spiers, A. & Crous, P. (2009). Multiple *Didymella* teleomorphs are linked to the *Phoma clematidina* morphotype. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 22, 56-62.
30. Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.