



## شناسائی گونه‌های تریکودرما با استفاده از توالی یابی جزئی ژن‌های nrRNA و tef1 همراه با معرفی *Trichoderma capillare* برای میکوفلور ایران

مهدی مهرابی کوشکی\*<sup>۱</sup> - مریم باورساد<sup>۲</sup> - رضا فرخی نژاد<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۷

### چکیده

گونه‌های تریکودرما به فراوانی در خاک‌های کشاورزی یافت می‌شوند و اغلب آن‌ها بعنوان عامل بیوکنترلی علیه بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کنند. آن‌ها همچنین بعنوان تولیدکننده‌های صنعتی آنزیم‌ها شناخته می‌شوند. با توجه به اهمیت این قارچ، شناسائی صحیح آن‌ها در سطح گونه ضروری می‌باشد. شناسائی گونه‌ها مبتنی بر خصوصیات ریخت‌شناسی با توجه به هموپلاسی زیاد در صفات ظاهری مناسب نمی‌باشد. در این تحقیق، ۴۰ جدایه تریکودرما از استان‌های اصفهان، اراک و همدان با استفاده از توالی یابی جزئی ژن‌های nrRNA و tef1 شناسائی شد. جدایه‌ها در محیط PDB کشت شد و توده میسلیومی با استفاده از کاغذ صافی جمع‌آوری شد. میسلیوم‌ها در لیوفیلیزر خشک-انجمادی و سپس از آن استخراج DNA شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت تکثیر حدود ۵۵۰ و ۹۰۰ جفت باز بترتیب از نواحی ITS و tef1 با استفاده از آغازگرهای عمومی و تخصصی انجام شد. قطعات تکثیری توالی یابی شد و بعد از ویراستاری و جستجو با استفاده از الگوریتم BLASTn، در بانک ژن ذخیره گردید. بر اساس صفات ریخت‌شناسی و آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی ITS و tef1 جدایه‌ها در هفت گروه گونه‌ای شامل *Trichoderma harzianum*، *T. pleuroticola*، *T. capillare*، *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum* و *T. virens* توزیع شدند. درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها با استرین‌های مرجع تپ بر اساس توالی tef1 ترسیم شد که در آن خوشه‌بندی فیلوژنتیکی تولید شده اصالت گونه‌ای جدایه‌های مورد بررسی را تأیید کرد. این اولین گزارش گونه *T. capillare* برای میکوفلور ایران است.

واژه‌های کلیدی: DNA-بارکدینگ، خوشه‌بندی فیلوژنتیک، ریخت‌شناسی

### مقدمه

مشخصات فیزیولوژیک و ریخت‌شناسی همچون میزان رشد، مشخصات میکروسکوپی پرگنه‌ها و مشخصات میکروسکوپی آن‌ها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها، ریشه‌های هوایی و ریشه‌های فرو رفته در محیط کشت، استفاده شده است (۸). استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی به این دلیل که در مورد بعضی گونه‌ها نیاز به مرحله جنسی می‌باشد و از طرفی هموپلاسی فراوانی در صفات فنوتیپی مشاهده شده است، اغلب منجر به شناسائی اشتباه می‌گردد (۵). بعضی از گونه‌های تریکودرما بصورت مخفی همراه جمعیت‌های گونه‌ای شناخته شده دیگر بصورت کمپلکس بسر می‌برند و تنها روش‌های مولکولی قادر است آن‌ها را متمایز کند. لذا، ابداع روش‌های مولکولی روش شناسائی مبتنی بر ریخت‌شناسی و فیزیولوژی را در شرایط کنونی نامعتبر ساخته است (۷).

یک DNA-بارکدینگ مناسب توالی کوتاهی از یک ژن است که تنوع نوکلئوتیدی زیادی در بین گونه‌ها و تنوع بسیار کمتری در بین

تریکودرما یک جنس قارچی تک‌نیایی با تلمومورف *Hypocrea* است (۱۶). گونه‌های تریکودرما اغلب به فراوانی در خاک‌های کشاورزی وجود دارند و بعنوان عامل بیوکنترلی بر علیه بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کنند (۱۱). آن‌ها همچنین بعنوان تولیدکننده‌های صنعتی بعضی از آنزیم‌ها همچون سلولاز شناخته می‌شوند (۱۷ و ۱۸). به دلیل این اهمیت، شناسائی دقیق آن‌ها در سطح گونه جهت انجام سایر تحقیقات ضروری می‌باشد.

به منظور شناسایی جدایه‌های تریکودرما در سطح گونه از

۱، ۲ و ۳- به ترتیب استادیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(Email: mhdmhrb@scu.ac.ir

\*) نویسنده مسئول:

DOI: 10.22067/jpp.v31i3.48738

سوسپانسیون اسپور تهیه شد. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور روی محیط کشت تا ۱/۴ ضعیف شده سیب‌زمینی-دکستروز- آگار (1/4-strength PDA) انجام شد (۱).

#### بررسی ریخت‌شناسی

جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت‌های PDA (Merck)، آرد ذرت - آگار (CMA, Sigma Aldrich) و سنتتیک حداقلی (SNA) در دمای ۲۸°C و تناوب نوری ۱۲-ساعته رشد داده شدند. مشخصات ریخت‌شناسی و فیزیولوژیک بسته به نوع جدایه و صفت ۲۵-۳ روز بعد از مایه‌زنی برداشت شد. اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی با استفاده از لنزهای شیئی 40X و 100x میکروسکوپ مائیک (Motic BA210 Basic Biological Light Microscope) مجهز به نرم‌افزار اندازه‌گیری انجام شد. مشخصات کیفی و کمی مشاهده شده برای هر جدایه در محیط نرم‌افزاری کلید آنلین مخصوص گونه‌های جنس تریکودرما (۲۳) ثبت و گونه‌های مورفومتریک بر اساس آن تفکیک شد.

#### تولید بیوماس قارچی و استخراج DNA

اسپورهای تریکودرما با نسبت ۱۰<sup>۵</sup> اسپور در میلی‌لیتر به محیط کشت PDB مایه‌زنی و ۴۸ ساعت در شرایط دمایی ۲۸°C و rpm ۱۲۰ نگهداری شدند. با استفاده از قیف و گاز سترون، توده میسیلیومی رشد یافته در محیط کشت‌های مایع PDB جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شستشو شد. توده میسیلیومی حاصله بلافاصله بعد از آب‌گیری اولیه، به لوله‌های سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت دو ساعت در فریزر ۸۰- نگهداری شدند. سپس درب لوله‌ها با قطعات گاز سترون جایگزین و در دستگاه لیوفیلیزر که قبلاً در دمای حدود C ۵۵- تنظیم شده بود، قرار داده شد و سپس پمپ خلاء روشن شد. نمونه‌ها در مدت ۱۶ ساعت نگهداری در این شرایط، خشک-انجمادی شد. توده میسیلیومی خشک شده به هاون چینی سترون منتقل و با استفاده از دسته هاون در درون ازت مایع پودر گردید. پودر ایجاد شده در همان لوله سانتریفوژ جمع‌آوری، درب‌گذاری، با پارافیلیم مسدود و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند. جداسازی DNA به روش ریدر و برودا (۲۱) با اندکی تغییر انجام گرفت. DNA با بارگذاری روی ژل آگاروز و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل eppendorf BioPhotometer plus) کمی‌سنجی و کیفیت‌سنجی شد (شکل ۱).

#### تکثیر ژن‌های ITS و tef1

از جفت آغازگر عمومی ITS1-F و ITS4-R (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و

جمعیت‌های یک گونه نشان می‌دهد (۱۲ و ۱۳). اگرچه توالی‌های ITS مربوط به ژن RNA ریبوزومی هسته (nrRNA) با موفقیت برای شناسایی و تمیز گونه‌های *Hypocrea* و *Trichoderma* استفاده شده است (۴) لیکن این ناحیه ژنی مناسب برای بعضی گونه‌ها نمی‌باشد. ژن *tef1* یک بارکدینگ مناسب برای گونه‌های فوزاریوم (۹) و تریکودرما (۴) شناخته شده است. امروزه توالی‌یابی بعضی از ژن‌های شاخص همچون *tubulin*، *rpb2*، *tef1*، *chi18-5* و *calmodulin* استفاده از آن‌ها بصورت انفرادی یا چندگانه در بررسی فیلوژنی جمعیت‌های تریکودرما و نهایتاً "تشخیص گونه‌های فیلوژنتیک (GCPSR) دقیق‌ترین روش جهت جداسازی گونه‌ها می‌باشند (۶ و ۷).

در ایران، در مطالعات گذشته گونه‌های *T. pleuroticola*، *T. asperellum*، *T. longibrachiatum*، *T. virens*، *T. brevicompactum*، *T. koningiopsis*، *T. ghanense*، *T. harzianum*، *T. hamatum atroviride*، *T. velutinum*، *T. inhamatum*، *T. citrinoviride*، *T. ceramicum*، *T. koningii*، *T. spirale*، *T. tomentosum*، *T. reesei*، *T. crassum* و *Hypocrea andinensis* و آن‌مورف *H. orientalis* از مناطق مختلف ایران جداسازی و شناسایی شده است (روحانی، اطلاعات منتشر نشده، ۱۴، ۱۹، ۲۰، ۲۶، ۲۸ و ۲۹). با در نظر گرفتن اینکه در یک دهه اخیر با بسط مطالعات مولکولی با استفاده از آنالیز چندین لوکوس ژنی ناپیوسته، تعداد گونه‌های تریکودرما افزایش یافته است و از طرفی هر گونه مطالعه در زمینه اکولوژی و توانایی بیوکنترلی قارچ تریکودرما مستلزم شناسایی دقیق جدایه‌های مورد استفاده در سطح گونه می‌باشد، در این تحقیق، ۴۰ جدایه تریکودرما از کلکسیون قارچی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز با استفاده از روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت.

#### مواد و روش کار

##### جدایه‌های تریکودرما و خالص‌سازی

در این مطالعه از کلکسیون قارچی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ۴۰ جدایه تریکودرما انتخاب شد. این جدایه‌ها از خاک‌های زراعی استان‌های اصفهان، همدان و اراک جداسازی شده بود. جدایه‌ها برای کوتاه‌مدت روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز- آگار (PDA) و برای درازمدت بصورت توده‌های اسپور مخلوط با ماسه نگهداری شدند. جدایه‌های تریکودرما به ظروف پتری محتوی PDA مایه‌زنی و جهت اسپوردهی، در شرایط نور و دمای ۲۸°C به مدت یک تا چهار هفته بسته به نوع جدایه، نگهداری شدند. سپس با استفاده از آب مقطر استریل محتوی ۰/۱ درصد توین ۸۰،

اینترون توالی‌های کد کننده پروتئین *tefl* در محیط نرم‌افزار BioEdit، از توالی‌های مرجع تأیید شده در پایگاه‌های اطلاعات ژنوم استفاده شد. توالی‌ها به پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI معرفی و با استفاده از الگوریتم BLASTn برای شناسایی هیتهای بلاست و توالی‌های شناخته شده‌ی مرتبط جستجو شد. هیتهایی که دارای بالاترین درصد شناسایی با کمترین شاخص E<sup>۱</sup> و بالاترین درصد پوشش توالی بودند بعنوان نزدیک‌ترین توالی در تأیید شناسایی‌های قبلی مبتنی بر ریخت‌شناسی، مد نظر قرار گرفتند. جهت تأیید فیلوژنتیکی هفت گونه شناسایی شده، توالی‌های *tefl* مربوط به جدایه‌های این مطالعه و هفت استرین تیپ از بانک ژن و پایگاه اطلاعات ژنوم کمسیون بین‌المللی جهت تاکسونومی *Trichoderma* و *Hypocrea* یا ISTH<sup>۲</sup> (<http://www.isth.info>) انتخاب شدند و با استفاده از برنامه ClustalW در نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 هم راستا شدند. درخت فیلوژنتیکی درست‌نمایی بیشینه (maximum likelihood) از طریق مدل Kimura 2-parameter (K2+G) با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6 ترسیم شد (۲۵).

## نتایج

جهت شناسایی اولیه، مشخصات ریخت‌شناسی و پرگنه که روی محیط PDA، CMD و SNA رشد یافتند، اندازه‌گیری شدند. با ورود این مشخصات در کلید آنلاین شناسایی تریکودرما (۳۳) جدایه‌ها در هفت گروه گونه‌ای قرار گرفتند (جدول ۱). یازده نماینده از این گروه‌ها برای شناسایی دقیق مولکولی استفاده شد. پس از ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی ITS و *tefl* مربوط به جدایه‌های مورد بررسی، توالی‌های تأیید شده در پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI نمایه شدند و دسترسی به آن‌ها تحت شماره‌های درج شده در جدول ۲ امکان‌پذیر است. با معرفی توالی‌های بدست آمده در بانک ژن و انجام عملیات جستجو با استفاده از الگوریتم BLASTn میزان شباهت آن‌ها با توالی استرین‌های مرجع آشکار شد (جدول ۲). بر اساس صفات ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ITS و *tefl* جدایه‌ها در هفت گروه گونه‌ای شامل *T. capillare* Samuels & Kubicek، *T. asperellum*، *T. pleuroticola* Yu & Park، *T. virens* (J.H. Mill., Samuels, Lieckf & Nirenberg)، *T. koningiopsis* Oudem. Giddens & A.A. Foster، *T. brevicompactum* Kraus, Kubicek & Gams و *T. harzianum* Rifai توزیع شدند (جدول ۲). این توالی‌ها همچنین به محیط‌های نرم‌افزاری اختصاصی تریکودرما همچون TrichO Key

(TCCTCCGCTTATTGATATGC) برای تکثیر ناحیه ITS (۲۷) و جفت آغازگر اختصاصی *tefl*171-F (CAAAATGGGTAAGGAGGASAAGAC) و *tefl*1997-R (CAGTACCGGCRGCRATRATSAG) برای تکثیر ژن *tefl* (از اگزون ۱ تا اگزون ۵ حاوی اینترون‌های ۱، ۲، ۳ و ۴) استفاده شد (۲۴). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم‌های ۵۰ μl با استفاده از ۵ μl بافر 10x Taq buffer، غلظت نهایی ۳mM از MgCl<sub>2</sub>، ۳ μl آغازگر پیش‌رو (10 μm)، ۳ μl آغازگر معکوس (10 μm)، ۲ μl dNTP (2.5 μm each) و ۰.۵ μl آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/μl)، ۲ μl DNA الگو (حدود ۲۰۰ نانوگرم) و آب مقطر دوبار تقطیر شده میلی‌کیور تا حجم ۵۰ μl تهیه و تکثیر با رژیم حرارتی ذیل در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در یک ترموسایکلر (مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler) با رژیم حرارتی تجربی ذیل تنظیم شد:

نوع رژیم	تعداد چرخه	درجه حرارت (°C)	مدت زمان (ثانیه)
ذوب اولیه	۱	۹۴	۱۸۰
		۹۴	۳۰
چرخه‌های اصلی	۳۵	۵۱ برای ITS ۵۷ برای <i>tefl</i>	۳۰
		۷۲	۹۰
پلی‌میراسیون نهایی	۱	۷۲	۳۰۰

## خالص سازی قطعات تکثیری و توالی‌یابی

محصولات PCR مربوط به هر جدایه در دو گروه ژن ITS و *tefl* در لوله‌های سانتریفوژ جمع‌آوری و با استفاده از روش رسوب با اتانول تغلیظ و شستشو شد (۲). برای این منظور، ۱/۱۰ حجم اسات سدیم ۳ مولار با pH 5.4 و ۲-۳ برابر حجم اتانول مطلق اضافه و به مدت یک شب در دمای ۸۰- نگهداری شد. سپس در دمای ۹۴ C و دور ۱۰۰۰۰ xg به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب حاصله با استفاده از اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. رسوب نهایی در ۲۵ μl آب مقطر میلی‌کیور حل و جهت توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای پیش‌رو و معکوس به شرکت ماکروژن ارسال شد.

## آنالیز توالی‌ها و تأیید فیلوژنتیکی گونه‌ها

توالی‌های بدست آمده از تکثیر ژن‌های ITS و *tefl* با استفاده از نرم‌افزار BioEdit v. 7.0.9.0 (۱۰) و ویراستاری شد. خوانش‌های پیش‌رو و معکوس هر ژن برای هر جدایه با استفاده از نرم‌افزار DNA Baser Sequence Assembler v4 ([www.DnaBaser.com](http://www.DnaBaser.com)) مونتاژ و بعنوان توالی تصحیح‌شده‌ای نهایی مدنظر قرار گرفت. جهت تفسیر و تعیین نواحی اکسون و

1- E Value: Expected value

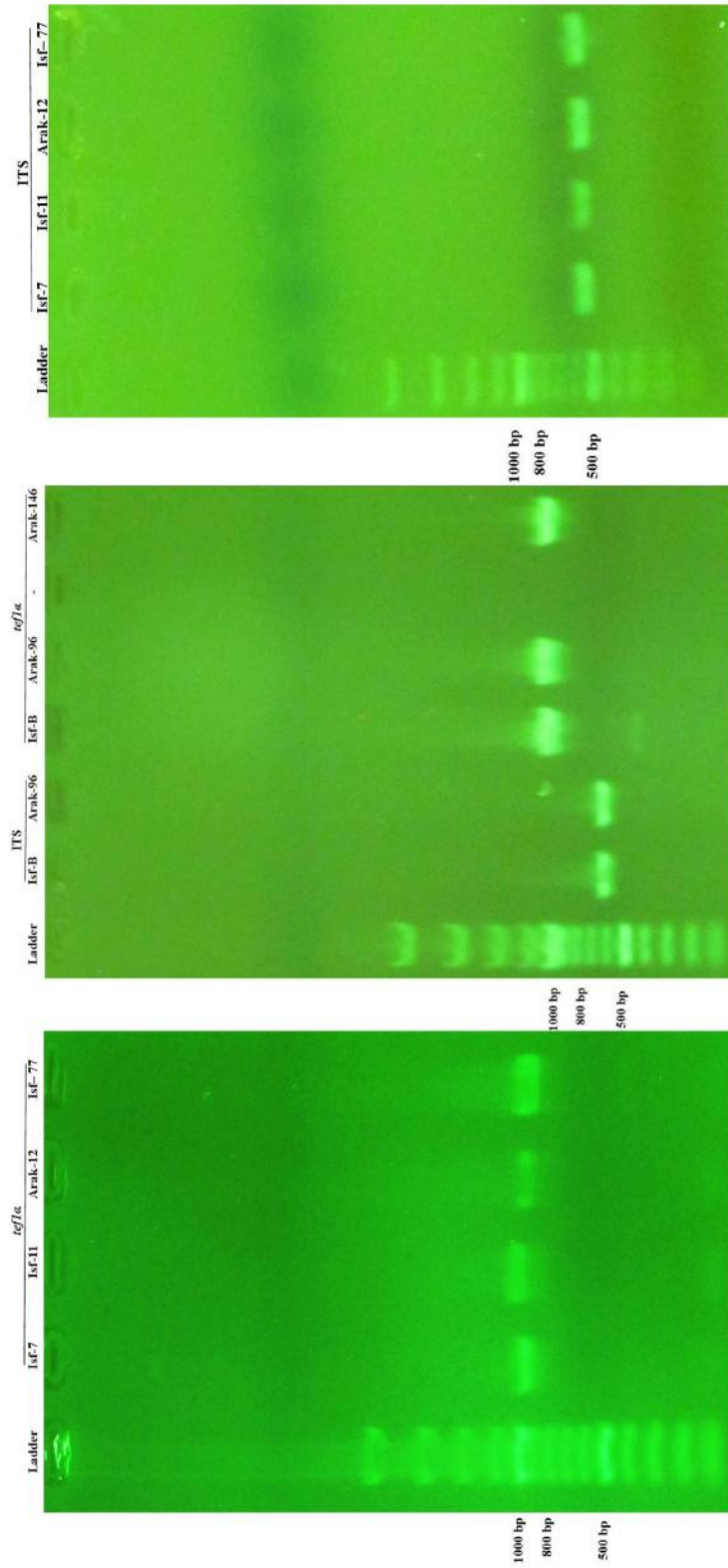
2- International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy

کلادهای با ارزش ۹۹، ۹۴، ۸۶، ۹۶، ۹۸، ۹۹ و ۹۹ درصد با استرین‌های تیپ همان گونه‌ها ایجاد کردند (شکل ۲) که این خوشه‌بندی فیلوژنتیکی اصالت گونه‌ای آن‌ها را تأیید می‌کند. این مطالعه اولین توالی ITS و طول بیشتری از ژن *tefl* (از اگزون ۱ تا اگزون ۵) را برای گونه *T. capillare* در بانک ژن نمایه کرد. در بررسی و تفسیر توالی *tefl* مربوط به این گونه، جهش‌های متعددی از نوع تغییر در نواحی کدکننده ناشی از اضافه شدن نوکلئوتید (insertion frameshift) مشاهده شد که موضوع جالبی برای مطالعات آینده، می‌تواند باشد (شکل ۳).

علاوه بر استفاده از نواحی ITS و *tefl* جهت شناسایی مولکولی هفت گونه مطالعه شده، مشخصات مهم ریخت‌شناسی و رشدی جدایه‌های مورد بررسی برای گونه‌هایی که قبلاً از ایران گزارش شده است در جدول ۱ بصورت خلاصه آورده شده است و گونه *T. capillare* Samuels & Kubicek که برای میکوفلور ایران جدید می‌باشد شرح داده می‌شود (شکل ۴).

(۵) و TrichoBLAST (۱۵) معرفی و با گونه‌های موجود در ISTH اعتبارسنجی شدند.

در جستجوی BLASTn، هر کدام از توالی‌های ITS و *tefl* برای جدایه‌های مربوط به گونه‌های *T. koningiopsis*، *T. virens* و *T. brevicompactum* شناسائی دقیق و بدون ابهامی ارائه کردند در صورتیکه توالی ITS برای جدایه‌های مربوط به گونه‌های *T. capillare*، *T. asperellum*، *T. pleurotica*، *T. harzianum* شناسائی معتبری ارائه نکرد و برای این گونه‌ها توالی *tefl* بعنوان DNA-بارکدینگ مناسب جهت تأیید نام گونه مد نظر قرار گرفت (جدول ۲). درصد شناسائی توالی‌ها جدایه‌های مورد بررسی به ترتیب برای توالی‌های *tefl* ۱۰۰-۹۶ درصد و ITS ۹۹-۸۸ درصد ارائه شد (جدول ۲). جهت تأیید فیلوژنتیکی گونه‌ها، درخت فیلوژنتیکی این جدایه‌ها با استرین‌های مرجع تیپ بر اساس توالی *tefl* ترسیم شد که در آن جدایه‌های شناسائی شده گونه‌های *T. virens*، *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum*، *T. harzianum*، *T. pleurotica* و *T. capillare* به ترتیب



شکل ۱- نقش الکتروفورس  $3 \mu\text{l}$  از محصولات واکنش PCR روی ژل آگاروز یک درصد مربوط به نواحی ITS و *tef1α* regions  
Figure 1- Electrophoresis map of  $3 \mu\text{l}$  of PCR products on 1% gel agarose belonging to ITS and *tef1α* regions

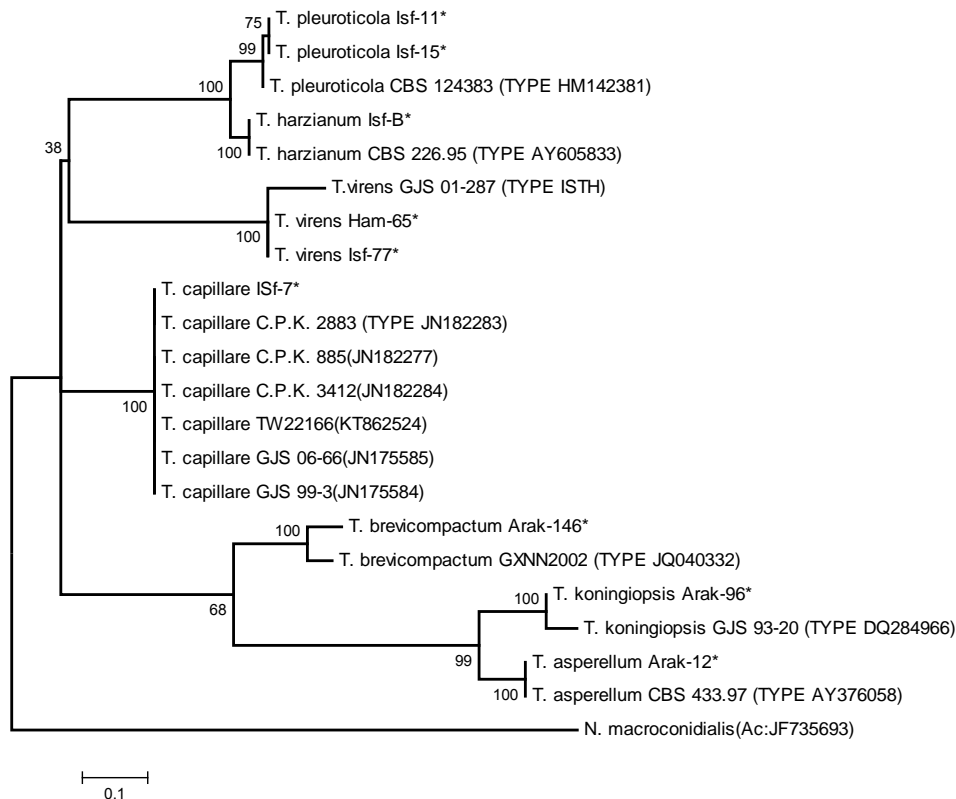
جدول ۱ - بعضی خصوصیات مهم فنوتیپی جدایه‌های مورد بررسی  
Table 1- Some of the important phenotypic characteristics of the isolates under survey

گروه مورفولوژیکی Morphometric groups	تعداد جدایه No of isolates	مشخصات روی PDA		مشخصات روی CMD		رشد شعاعی ،SNA روی ۳۵ °C در ۷۲ ساعته در تاریکی Radial growth, darkness 72h, 35 °C	رشد شعاعی ،SNA روی ۳۵ °C در ۷۲ ساعته در تاریکی Radial growth on SNA, 35 °C, 72h	گونه تأیید شده در آنایز بلاست و فیلوژنتیک Confirmed species in BLASTn and phylogeny				
		مشخصات روی PDA		مشخصات روی CMD								
		رشد شعاعی، ۷۲	رنگدانه Pigment	جوش Pustule	شکل Shape				تزیینات Ornamentation	طول Length	عرض Width	
<i>T. harzianum</i>	13	49-56	33-41	different	No	globose to ovoidal	smooth	2.7-3.5	2.5-3.0	in most cultures not observed	25-33	<i>T. harzianum</i>
<i>Trichoderma sp</i>	1	55	60	pale yellow	hairy	ellipsoidal	roughened	3.0-4.0	3.0-3.5	not observed	45	<i>T. capitata</i>
<i>T. pleuroticola</i>	3	31-43	<12	no	No	subglobose	smooth	2.5-3.2	2.2-3.0	not forming in all isolates	5-14	<i>T. pleuroticola</i>
<i>T. asperellum</i>	3	42-51	28-35	no	cottony	subglobose	Little warted	3.5-4.5	3.0-4.0	abundant	23-32	<i>T. asperellum</i>
<i>T. virens</i>	14	39-46	19-26	sometime yellow	no	ellipsoidal to ovoid	smooth	4.5-4.7	3.9-4.0	abundant	-	<i>T. virens</i>
<i>T. koningiopsis</i>	1	55	no growth	no	cottony	ellipsoidal	smooth	3.5-4.5	2.2-3.0	abundant	No growth	<i>T. koningiopsis</i>
<i>T. brevicompactum</i>	5	39-45	<13	no	cottony	globose to ovoidal	smooth	2.7-3.2	2.2-2.6	Rarely seen	2-7	<i>T. brevicompactum</i>

جدول ۲- مقایسه هیتهای اصلی ارائه شده توسط بانک ژن برای توالی ناحیه ITS و *tefla* جدایه‌های مورد تحقیق

Table 2- Comparison of GenBank Top-Hits for the ITS and *tefla* regions of the isolates under survey

Isolate	ITS sequence based identification			<i>tefla</i> sequence based identification			گونه تایید شده در فیلوژنی Confirmed Species in phylogeny
	شماره دسترسی Accession number	گونه شناسائی شده Species identified	شباهت identity	شماره دسترسی Accession number	گونه شناسائی شده Species identified	شباهت identity	
Isf-7	KP985637	Aj507135	92%	KP985647	JN175584	96%	<i>T. capillare</i>
Isf-11	KP985638	JX232596	98%	KP985648	KJ871080	99%	<i>T. pleuroticola</i>
Arak-12	KP985639	JF304317	88%	KP985655	EF185999	100%	<i>T. asperellum</i>
Isf-15	KP985641	HM142362	99%	KP985649	KJ871080	99%	<i>T. pleuroticola</i>
Ham-65	KP985642	HM046563	92%	KP985650	EU280047	98%	<i>T. vires</i>
Isf-77	KP985643	KP009289	99%	KP985651	EU280047	98%	<i>T. vires</i>
Arak-96	KP985644	KP316424	89%	KP985652	KJ652475	99%	<i>T. koningtopsis</i>
Arak-146	KP985645	KM225889	96%	KP985653	EU338294	100%	<i>T. brevicompactum</i>
Isf-B	KP985646	AY605716	98%	KP985654	HG931209	99%	<i>T. harzianum</i>
Arak-6	KP985636	EF442080	99%	-	-	-	<i>T. harzianum</i>
Arak-14	KP985640	JX473721	93%	-	-	-	<i>T. vires</i>



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌ها که در آنالیز درست‌نمائی بیشینه بر اساس توالی‌های *tef1* با استفاده از مدل K2+G بدست آمده است. درصد تکرار کلادها در ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب (بوت‌استرپ) در محل ریشه کلادها درج شده است. درخت با استفاده از گونه نزدیک *N. macroconidialis* ریشه‌دار شده است

Figure 2- The phylogram of isolates constructed through maximum likelihood analysis based on *tef1* sequence under K2+G model. The percentages of replicate trees in the bootstrap test (1000 replicates) have been shown next to the branches. The tree was rooted to close species of *N. macroconidialis*

شد. تراکم جوش‌ها بیشتر در اطراف پرگنه، مخصوصاً مرز سطح محیط کشت با دیواره پتری، مشاهده شد. اسپورزائی در شرایط تناوب نوری رشد کشت‌های قارچ، بصورت دواپیر متحدالمرکز مشاهده نگردید. تولید کلامیدوسپور مشاهده نشد. کنیدیوفورها بی‌رنگ، دارای دیواره صاف و تولید انشعابات فرعی که هرکدام به تعدادی فیالید در انتها منجر شد اگرچه تعداد کمی از این کنیدیوفورها تولید فیالیدهای منفرد بصورت انتهائی و گهگاهی جانبی کردند. فیالیدها تنگی‌شکل تا تقریباً استوانه‌ای، کاملاً "متورم در نیمه پایینی، بیشتر مستقیم و متقارن ولی گاهی خمیده قلاب‌مانند و نامتقارن، اندازه آن‌ها بر اساس ۸۰ اندازه‌گیری (۱۳) ۱۰ - ۵/۵ (۴/۵) میکرومتر طول و ۲/۵-۳/۵ (۴) میکرومتر پهنا در متورم‌ترین قسمت مشاهده شد. کنیدیوم‌ها تقریباً کروی تا بیضوی، سطح زبر با رنگ سبز روشن، ابعاد آن‌ها بر اساس ۸۰ اندازه‌گیری (۴/۵) ۴-۲/۵ میکرومتر قطر طولی و (۴) ۳-۲/۵ (۲) میکرومتر قطر عرضی مشاهده شد.

*Trichoderma capillare* G.J. Samuels & C.P. Kubicek, Fungal Diversity 55: 83 (2012) (شکل ۴)

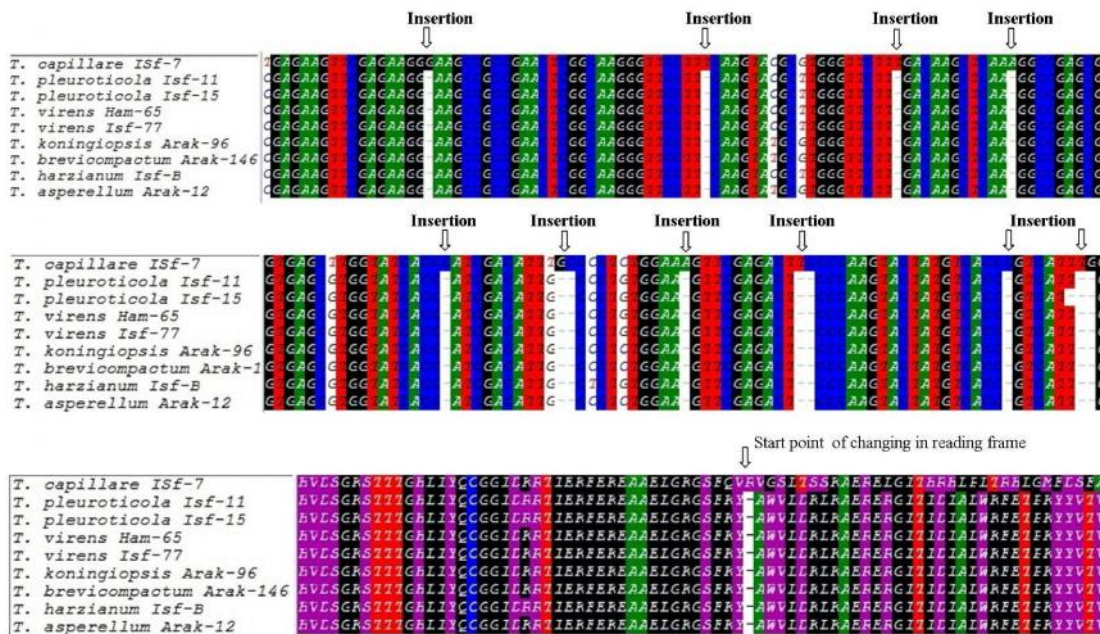
میزان رشد شعاعی پرگنه بر اساس سه تکرار روی محیط کشت PDA در دمای  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  و  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  با اصلاح اثر تنش انتقال دیسک میسلیومی، به ترتیب ۵۵ و ۶۰ میلی‌متر پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد. این میزان روی محیط کشت SNA در دمای  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ ، ۴۵ میلی‌متر ثبت شد. ریشه‌های قارچ روشن و عموماً فرورفته و سطح پرگنه کاملاً صاف مشاهده شد. سطح روئی و پشتی پرگنه رشد کرده روی محیط PDA در ابتدا روشن و با تولید فراوان رنگدانه زرد به زردی گرایش پیدا کرد. زردی پرگنه با گذشت زمان و نگهداری دو هفته‌ای در دمای آزمایشگاه کاهش پیدا کرد. بر خلاف اکثر گونه‌ها، اسپورزائی روی محیط PDA و در شرایط نگهداری در نور ممتد بسیار با تأخیر و از هفته دوم بصورت ظهور جوش‌های عموماً کروی برجسته پرزدار سبز روشن و متراکم با اندازه‌های متفاوت تا ۵ میلی‌متری انجام



بحث

گونه در سال ۲۰۱۲ با استفاده از بررسی‌های فیلوژنتیک از سایر جمعیت‌های تریکودرما جدا و بعنوان گونه مستقل در بخش *Longibrachiatum* قرار گرفت (۲۲). همچنین، این مطالعه توالی ناحیه ITS و توالی اینترون‌های ۲ و ۳ مربوط به ژن *tefl* را برای اولین بار به بانک ژن معرفی و آن را ثبت کرد.

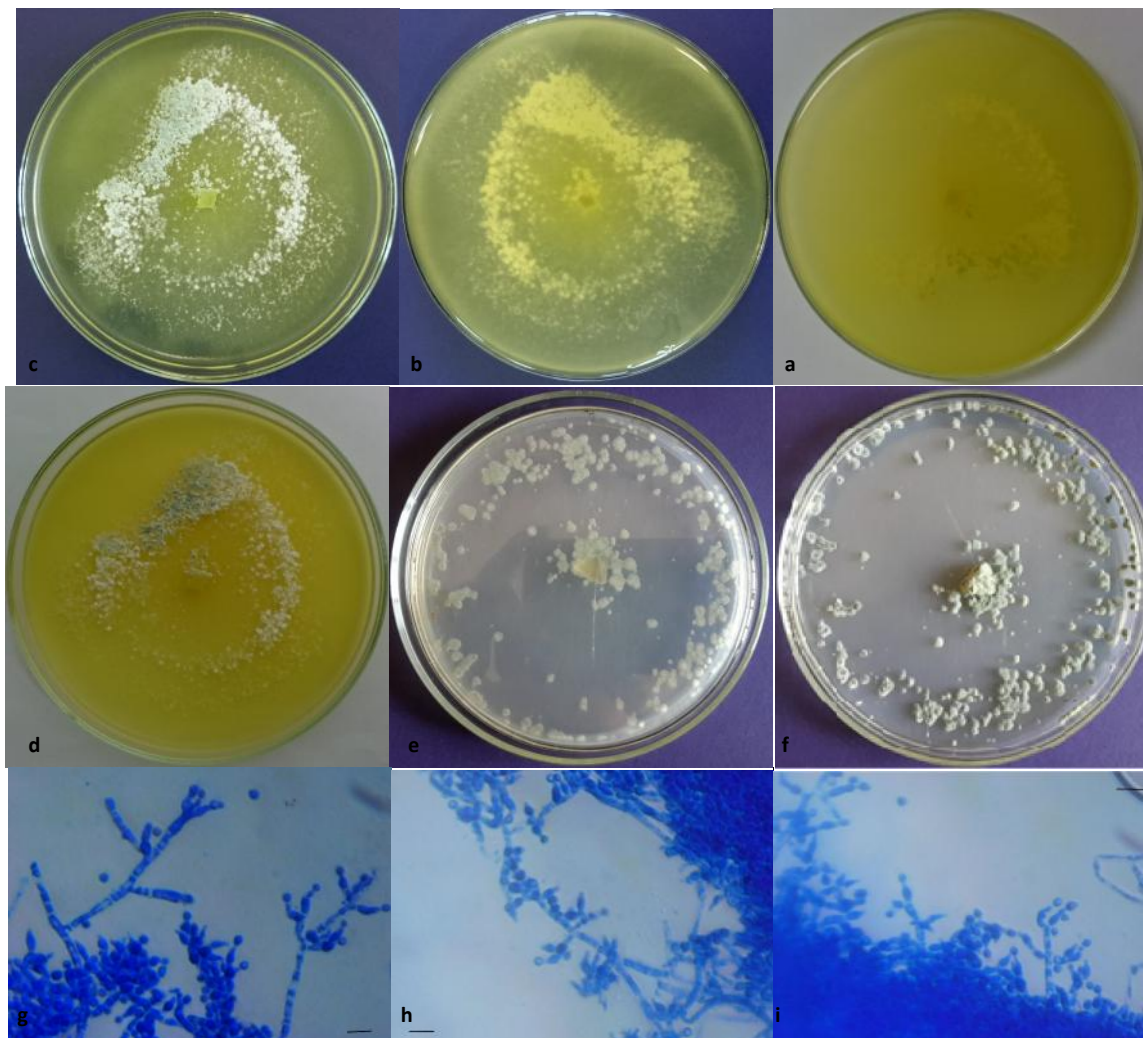
شناسایی‌های متفاوت گونه‌ها بر اساس توالی‌های ITS و *tefl* ثابت می‌کند که تشخیص گونه‌ها بر اساس توالی یک ژن مخصوصاً "توالی ITS برای گونه‌های تریکودرما دقیق نمی‌باشد و این در مطالعات قبلی نیز به اثبات رسیده است (۴). گونه *T. capillare* برای اولین بار در این مطالعه برای میکوفلور ایران گزارش می‌شود. این



شکل ۳- موتاسیون‌های چندگانه از نوع تغییر در نواحی کدکننده جدایه *T. capillare* Isf-7 در مقایسه با سایر جدایه‌های مورد بررسی  
Figure 3- Multiple insertion-type frame shifts in *tefl* reading frame of *T. capillare* Isf-7 compare to other isolates surveyed

برای میکوفلور قارچی ایران گزارش کردند. گونه‌های *T. harzianum* و *T. virens* تقریباً در تمام تحقیقات راجع به تریکودرما در حوزه‌های مختلف جغرافیائی در ایران گزارش شده است (روحانی، اطلاعات منتشر نشده، ۱۴، ۱۹، ۲۰، ۲۶، ۲۸ و ۲۹) و این غالب بودن این گونه‌ها را در جمعیت تریکودرماي خاک و فراریشه نشان می‌دهد. نتایج این تحقیق، نشان می‌دهد که در مطالعات شناسایی گونه و ارزیابی‌های فیلوژنتیک استفاده از چند ژن ضروری می‌باشد (جدول ۱). تنها جدایه *T. capillare* Isf-7 در این مطالعه با استفاده از جستجوی بلاست توالی ناحیه *tefl* شناسایی شد. همچنین تأیید گونه‌های *T. pleuroticola* و *T. asperellum* با استفاده از جستجوی بلاست ژن *tefl* انجام شد. دود و همکاران (۳) نیز اذعان کردند شناسایی گونه‌های جنس تریکودرما با استفاده از توالی ITS کافی برای جداکردن تمام گونه‌ها نمی‌باشد.

در این بررسی، شش گونه *T. pleuroticola*، *T. asperellum*، *T. brevicompactum*، *T. koningiopsis*، *T. virens* و *harzianum* نیز شناسایی شدند که قبلاً برای میکوفلور ایران گزارش شده است (روحانی، اطلاعات منتشر نشده، ۱۴، ۱۹، ۲۰، ۲۶، ۲۸ و ۲۹). نیمی و همکاران (۱۹) جدایه‌هایی از خاک و فیلوسفر مزارع برنج در نوار شمالی کشور و ساحل جنوبی دریای خزر جمع‌آوری کردند و بعد از شناسایی مولکولی با استفاده از نواحی ITS، جدایه‌ها در شش گروه گونه‌ای *T. atroviride*، *T. asperellum*، *T. virens*، *T. hamatum*، *T. brevicompactum*، *T. harzianum* و *T. virens* قرار گرفتند. نظمی و همکاران (۲۰) گونه‌های تریکودرما همراه خاک و چوب پوسیده جمع‌آوری شده از استان‌های شمال کشور (گیلان، مازندران و گلستان) را بررسی کردند و در این بررسی، گونه‌های *T. ceramicum*، *T. reesei*، *T. crassum*، *T. anamorf*، *Hypocrea andinensis* و *H. orientalis* را بعنوان گونه‌هایی جدیدی



شکل ۴- *T. capillare* Isf-7: a و b. پرگنه ۷ روزه رشد یافته روی PDA، c و d. پرگنه ۱۰ روزه رشد یافته روی PDA، e و f. پرگنه ۲۵ روزه رشد یافته روی PDA، g، h و i. کنیدیوم، کنیدیوم و فیالیدها از کشت‌های ۱۰ روزه. خط مقیاس ۱۰ میکرومتر است  
 Figure 4- a and b, *T. capillare* Isf-7: 7-days colony on PDA. c and d, 10-days colony on PDA. e and f, 25-days colony on PDA. Conidiophores, conidia and phialids from 10-days cultures, Scale bars: 10  $\mu$ m

موجودات مختلف یافت می‌شوند باعث افزایش گونه‌های قارچی از جمله تریکودرما شده است (۷).  
 بطور کلی با توجه به شباهت‌های زیاد گونه‌های نزدیک از نظر صفات ظاهری و هم‌پلاسی فراوان در گونه‌های قارچی، استفاده از صفات مولکولی از جمله توالی‌های DNA جهت شناسائی گونه و کشف ارتباطات فیلوژنتیک آن‌ها افق‌های روشنی را در علم سیستماتیک قارچی نوید خواهد داد و سیر شتابان تحول در سیستماتیک قارچ‌ها در سال‌های اخیر نیز محصول همین رویکرد می‌باشد. تحقیق اخیر نیز در همین راستا با شناسائی مولکولی هفت گونه تریکودرما، گونه‌ای جدید *T. capillare* را برای میکوفلور ایران معرفی کرده است.

یک ژن یا یک ناحیه از DNA که توالی نوکلئوتیدی کوتاهی باشد و تنوع آن در افراد داخل یک گونه بسیار کمتر از بین گونه‌ها باشد (تنوع بین گونه‌ای بیشتر از تنوع درون گونه‌ای باشد) می‌تواند بعنوان DNA بارکدینگ جهت تشخیص گونه‌ها استفاده شود (۱۲) و (۱۳) و تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که نواحی ITS برای گونه‌های تریکودرما این ویژگی را ندارد و به تنهایی قادر به جدا کردن گونه‌ها نیست (۵). ناحیه ژنی *tefl* DNA بارکدینگ و مارکر مناسبی جهت تمییز گونه‌های قارچی از جمله *Trichoderma* و *Tolmorf* آن استفاده می‌کند (۵). از طرفی توسعه مفهوم گونه فیلوژنتیک با استفاده از تعدادی ژن که ارزش طبقه‌بندی دارند و ارتولوگ آن‌ها در

## منابع

- 1- Ainsworth G.C. 1971. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 6th ed. Common wealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- 2- Crouse J., and Amorese D. 1987. Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *Focus*, 9: 3-5.
- 3- Dodd S., Crowhurst R.N., Rodrigo A.G., Samuels G.J., Hill R.A., and Stewart A. 2003. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, 4: 32-39.
- 4- Druzhinina I., and 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.
- 5- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komon M., Bissett J., Szakacs G., and Kubicek C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42: 813-828.
- 6- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., and Kubicek C.P. 2006. The first one hundred of *Trichoderma* species is characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47: 55-64.
- 7- Druzhinina I.S., Komo -Zelazowska M., Ismaiel A., Jaklitsch W., Mullaw T., Samuels G.J., and Kubicek C.P. 2012. Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genetics and Biology*, 49: 358-368.
- 8- Gams W., and Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-31. In C.P. Kubicek and G.E. Harman (eds.) *Trichoderma and Gliocladium*, Taylor & Francis, London.
- 9- Geiser D.M., Jimenez Gasco M.M., Kang S., Mkalowska I., Veeraraghavan N., Ward T.J., Zhang N., Kuldau G.A., and O'Donnell K. 2004. *Fusarium-IDv.1.0*: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 473-479.
- 10- 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.
- 11- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., and Lorito M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2:43-56.
- 12- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., and deWaard J.R. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B*, 270: 313-321.
- 13- Hebert P.D.N., Ratnasingham S., and deWaard J.R. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London: Series B*, 270: 96-99.
- 14- Karimi S. 2005. Help to identification of *Trichoderma* species and endomycorrhizae as useful fungi of walnut rhizosphere in Hamadan province. MSc thesis, agriculture faculty, Buali Sina University of Hamadan, Iran. (In Persian with English abstract)
- 15- Kopchinskiy A.G., Komon M., Kubicek C.P., and Druzhinina I.S. 2005. TrichoBLAST: A multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. *Mycological Research*, 109:657-660.
- 16- Kullnig-Gradinger C., Szakacs G., and Kubicek C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research*, 106:757-767.
- 17- Mehrabi-Koushki M., Rouhani H., and Farsi M. 2011. Genetic manipulation of fungal strains for Improvement of heterologous genes expression (a minireview). *African Journal of Biotechnology*, 10: 7939-7948.
- 18- Mehrabi-Koushki M., Rouhani H., and Mahdikhani-Moghaddam E. 2012. Differential display of abundantly expressed genes of *T. harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. *Current Microbiology*, 65:524-533.
- 19- Naeimi S., Khodaparast S.A., Javan-Nikkhah M., Vagvolgyi. C., and Kredics L. 2011. Species patterns and phylogenetic relationships of *Trichoderma* strains in rice fields of southern Caspian sea, Iran. *Cereal Research Communications*, 39: 560-568.
- 20- Nazmi-Roodsari F., Zafari D., Khodaparast A., and Rouhani H. 2007. Introducing some new species of *Trichoderma* for Iran. *Rostaniha*, 8:67-88.
- 21- Raeder U., and Broda P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- 22- Samuels G.J., Ismaiel A., Mullaw T.B., Szakacs G., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., and Jaklitsch W.M. 2012. The *Longibrachiatum* Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55:77-108.
- 23- Samuels G.J., Chaverri P., Farr D.F., and McCray E.B. 2016. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA, available from: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>.
- 24- Shoukouhi E., and 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>.
- 25- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.

- 26- Vahabi K. 2004. Genetic diversity of *Trichoderma* species related to *Agaricus bisporus* mushroom using morphological and molecular methods. MSc. Thesis, agriculture faculty, Isfahan University of the technology, Iran. (In Persian with English abstract)
- 27- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. P315–322. In: MA Innis et al. (ed.) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, New York, USA.
- 28- Zafari D., Zare R., Ershad D., and Alizadeh A. 2003. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 38: 9-15. (In Persian with English abstract)
- 29- Zafari D., Zare R., Ershad D., and Alizadeh A. 2004. Introduction of three new species of *Trichoderma* for mycoflora of Iran. Rostaniha, 5: 63-65. (In Persian with English abstract)