ارزیابی روابط فیلوژنتیکی گونه‌های *Trichoderma* به دست آمده از شالیزارهای استان مازندران بر اساس توالی‌های ژن *tef1α*

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF *Trichoderma* SPECIES ISOLATED FROM PADDY FIELDS OF MAZANDARAN PROVINCE BASED ON SEQUENCE ANALYSIS OF *tef1α* GENE

شهرام نعیمی[۱*]، سید اکبر خداپرست[۲]، محمد جوان نیکخواه[۳]، چابا واگولجی[۴] و لاسلو کردیچ[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۳۱)

چکیده

جنس *Trichoderma* از مهم‌ترین جنس‌های قارچی در زمینه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، افزایش رشد و القای مقاومت در گیاهان به شمار می‌رود. ارتباط فیلوژنتیکی ۸۱ جدایه متعلق به شش گونه از این جنس (شامل چند جدایه بیوکنترل امید بخش) که از مزارع برنج استان مازندران به دست آمده‌اند، بر اساس توالی قطعه‌ای از ژن *tef1α* بررسی شد. توالی‌های ژن مذکور در جدایه‌های مورد آزمایش به همراه توالی‌های به دست آمده از بانک ژن هم‌ردیف‌سازی شدند و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش‌های پیوست همسایه‌ها، پارسمونی بیشینه و تکامل کمینه انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های متعلق به *T. harzianum* (فراوان‌ترین گونه شالیزار در این تحقیق) ۱۴ هاپلوتیپ مختلف را تشکیل دادند که در پنج گروه مجزا قرار گرفتند و بنابراین این گونه‌ی مرکب، بیشترین تنوع ژنتیکی را به نمایش گذاشت. جدایه‌های *T. virens* (دومین گونه فراوان مزارع برنج مازندران در این بررسی) فقط در دو هاپلوتیپ گروه‌بندی شدند. گونه‌های *T. atroviride* و *T. hamatum* با سه و دو جدایه به ترتیب سه و دو هاپلوتیپ را تشکیل دادند. سویه‌های بیوکنترل متعلق به یک گونه دارای هاپلوتیپ‌های متفاوتی بودند و همراه با سویه‌های غیر آنتاگونیست در شاخه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. در نتیجه، هاپلوتیپ منحصر به فردی از *tef1α* که به خاصیت آنتاگونیسم مرتبط باشد، بر اساس تجزیه و تحلیل توالی *tef1α* تشخیص داده نشد. ارتباطی بین هاپلوتیپ و مکان جغرافیایی وجود نداشت و از یک مزرعه، گونه‌ها و هاپلوتیپ‌های مختلف جداسازی شدند.

واژه‌های کلیدی: تنوع زیستی، هاپلوتیپ، برنج، کنترل بیولوژیک، ایران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی shnaeimi@yahoo.com

۱. استادیار پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک

۲. دانشیار دانشگاه گیلان، دانشکده کشاورزی، بخش گیاه‌پزشکی

۳. استاد دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه گیاه‌پزشکی

۴. به ترتیب استاد و دانشیار دانشگاه سِگِد (مجارستان)، دانشکده علوم و انفورماتیک، بخش میکروبیولوژی

مقدمه

اعضای جنس *Trichoderma* بخش مهمی از زیست‌توده خاک‌های مختلف را در اقلیم‌های متنوع جغرافیایی تشکیل می‌دهند (Hagn *et al*. 2007) و نیز به صورت رورست و درون‌رست در اندام‌های هوایی گیاهان به سر می‌برند (Cordier *et al*. 2007; Xia *et al*. 2011). آنها هم‌چنین کاربرد زیادی در صنعت، کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، ایجاد مقاومت القایی و افزایش رشد گیاهان دارند (Sanz *et al*. 2004). علاقه علمی ویژه به این جنس قارچی تا حدود زیادی به توسعه بازار فرآورده‌های ارگانیک کشاورزی در جهان مرتبط است (Druzhinina *et al*. 2010b). با این حال، ثبات ژنتیکی این قارچ‌ها در طبیعت، ساختار جمعیت، استراتژی‌های تکثیر و پراکنش آنها به خصوص در اکوسیستم‌های کشاورزی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (Druzhinina *et al*. 2010a).

بسیاری از گونه‌های *Trichoderma* فرم جنسی شناخته شده‌ای ندارند و به نظر می‌رسد که حداقل بعضی، به صورت میتوتیک و همسانه‌ای باشند (Gams & Bissett 1998). از آن جایی که صفات مورفولوژیکی برای شناسایی دقیق و بدون ابهام گونه‌های *Trichoderma* و نیز تعیین حدود گونه‌های بیولوژیکی و ارزیابی تنوع زیستی نامناسب و ناکافی است (Samuels 2006)، تاکسونومیست‌ها به سراغ روش‌های مولکولی رفته‌اند (Maymon *et al*. 2004). *دروزینینا و همکاران* (Druzhinina *et al*. 2005) یک سیستم بارکُدگذاری DNA (DNA barcoding) را برای شناسایی دقیق و سریع جدایه‌های تریکودرما در حد گونه در قالب برنامه *TrichOKEY* 2.0 ابداع کردند. توسعه ابزارهای مولکولی، شناسایی دقیق و درست جدایه‌های *Trichoderma* و ترسیم شجره‌های فیلوژنتیکی را ممکن ساخته است (Samuels 2006). طی ۴۴ سال گذشته، تعداد گونه‌های تریکودرما از نُه گروه گونه‌ای (Rifai 1969) به حدود ۱۵۰ گونه (شامل گونه‌های فیلوژنتیکی) افزایش یافته است که اکثر آنها طی ۱۲ سال اخیر توصیف شده‌اند (Samuel *et al*. 2012).

آنالیز فیلوژنتیکی جنس *Trichoderma* برای اولین بار توسط *کیندرمان و همکاران* (Kindermann *et al*. 1998) با استفاده از توالی‌های ناحیه ITS1 انجام شد. آنها از این توالی‌ها برای تعیین روابط فیلوژنتیکی گونه‌های بخش *Pachybasium* استفاده کردند و نشان دادند که این بخش تک نیایی نیست. *اُسپینا-گیرالدو و همکاران* (Ospina-Giraldo *et al*. 1999) هم نواحی ITS جدایه‌های *T. harzianum* (شامل بیوتیپ‌های بیمارگر عامل کپک سبز در قارچ خوراکی و سویه‌های بیوکنترل) را مورد آنالیز فیلوژنتیکی قرار دادند و نشان دادند که اگرچه جدایه‌های بیمارگر و بیوکنترل دارای یک جد مشترک هستند، اما گروه‌های متفاوت فیلوژنتیکی را تشکیل می‌دهند. پس از آن، مطالعات زیاد دیگری با هدف ارزیابی تنوع درون گونه‌ای و نیز مطالعه فیلوژنی گونه‌های تریکودرما با استفاده از توالی ناحیه ITS انجام شده است (Hermosa *et al*. 2000; Kullnig *et al*. 2000; Dodd *et al*. 2000; Lieckfeldt *et al*. 2001; Lee & Hseu 2002; Kubicek *et al*. 2003; Naeimi *et al*. 2011).

اکثر مطالعات فیلوژنتیکی تریکودرما بر اساس توالی‌های ناحیه ITS صورت گرفته است. دلیل آن تعداد کپی‌های فراوان آن در ژنوم (بیش از ۹۰ کپی) و تکثیر آسان این ناحیه است. هر چند که توالی‌های این ناحیه برای شناسایی در حد گونه مناسب است اما تفکیک فیلوژنتیکی کافی ارائه نمی‌کند (Dodd *et al*. 2000;

Druzhinina and Kubicek 2005). ژن دیگری که در مطالعات تاکسونومی و فیلوژنی قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد ژن تک نسخه‌ای translation elongation factor1-alpha (EF-1α=*tef1*α) می‌باشد که از اگزون‌ها و اینترون‌های مختلفی تشکیل می‌شود. از آنجایی که *tef1*α متنوع‌تر از ITS است، بهتر می‌تواند تفاوت بین گونه‌های نزدیک به هم را منعکس سازد (Samuels 2006). محققین بسیاری از این ژن برای مطالعه تاکسونومی و فیلوژنی گونه‌های مختلف تریکودرما بهره برده‌اند (Samuels *et al*. 2002; Dodd *et al*. 2002; Wuczkowski *et al*. 2003; Holmes *et al*. 2004, Zhang *et al*. 2005; Hoyos-Carvajal *et al*. 2009; Druzhinina *et al*. 2010a, 2010b; Belayneh Mulaw *et al*. 2010). اخیراً نیز از توالی *tef1*α برای شناسایی مولکولی جدایه‌های تریکودرما در مواردی که توالی ناحیه ITS برای این کار مناسب نبود، استفاده شده است (Blaszczyk *et al*. 2011; Xia *et al*., 2011; Sun *et al*., 2012).

علاوه بر مطالعات تک ژنی، آنالیز توالی‌های DNA مربوط به چندین ژن (شامل *tef1*α) نیز برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی گونه‌های جنس *Trichoderma* انجام شده است (Kullnig-Gradinger *et al*. 2002; Chaverri *et al*. 2003; Bissett *et al*. 2003). *دروزینینا و همکاران* (Druzhinina *et al*. 2010a) از چهارمین اینترون *tef1*α و دو اینترون ژن *cal1* برای فیلوژنی، روشن شدن وضعیت تکاملی و رابطه آنامورف-تلئومورف در گونه صنعتی *T. reesei/H. jecorina* استفاده کردند. *دروزینینا و همکاران* (Druzhinina *et al*. 2010b) از پنج نشانگر فیلوژنتیکی مختلف شامل *tef1*α برای مطالعه تاریخچه گونه‌زایی در هولومورف *H. lixii /T. harzianum* استفاده کردند.

شناسایی و توصیف دقیق و همه جانبه عوامل کنترل بیولوژیک باید قبل از استفاده تجاری و کاربردشان در طبیعت صورت گیرد (Hermosa *et al*. 2000). هم‌چنین به دلیل اهمیت اقتصادی تریکودرما و کاربردهای موفقیت آمیز آن در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی در مزرعه، درک درستی از بیولوژی، تنوع و جغرافیای زیستی این جنس قارچی در کشور ضروری است. مطالعه ساختار فیلوژنتیکی گونه‌های تریکودرمای مورد استفاده در کنترل بیولوژیک می‌تواند در انتخاب جدایه‌های مؤثر، مفید باشد. زیرا تفاوت‌های کارآیی جدایه‌ها ممکن است با فیلوژنی قابل تشخیص باشد (Chaverri *et al*. 2003). بنابراین با توجه به نبود دانش کافی در این زمینه، هدف از انجام این تحقیق، تعیین تنوع زیستی و ارزیابی فیلوژنی جدایه‌های جنس تریکودرما به دست آمده از شالیزارهای مازندران (با تأکید بر سویه‌های بیوکنترل) بر اساس آنالیز توالی بخشی از ژن *tef1*α است.

روش بررسی

جدایه‌های جنس *Trichoderma*

تعداد ۸۱ جدایه تریکودرمای استفاده شده در این تحقیق قبلاً از شالیزارهای مازندران جداسازی و خالص‌سازی شده‌اند (Naeimi *et al*. 2010b). اسامی این جدایه‌ها، مکان‌های جغرافیایی، منشأ جداسازی و رس‌شمار آنها در GenBank در جدول ۱ نمایش داده شده است. این جدایه‌ها به شش گونه تریکودرما تعلق دارند و از مناطق مختلف شالیکاری در سراسر استان به دست آمدند. این شش گونه و فراوانی آنها به صورت *T. harzianum* (۴۹)، *T. Virens* (۲۵)، *T. atroviride* (۳)، *T. hamatum* (۲)، *T. asperellum* (۱) و *T. brevicompactum* (۱) است. هم‌چنین سویه‌های مؤثر در کنترل *Rhizoctonia solani*

جدول ۱. جدایه‌های *Trichoderma* spp. **مورد استفاده در این تحقیق و رس‌شمار** GenBank **آنها**

Table 1. *Trichoderma* isolates used in this study and their GenBank accession numbers

Species	Strain code [a]	GenBank accession nos.[b]
T. asperellum	BS3-8 [c]	FJ618574
T. atroviride	AS8	FJ618568
T. atroviride	DS121	FJ618569
T. atroviride	CS5-1	FJ618570
T. brevicompactum	DS701	FJ618573
T. hamatum	DS302	FJ618571
T. hamatum	SS11-2	FJ618572
T. harzianum	AD1-2	FJ618577
T. harzianum	SS6-1	FJ618578
T. harzianum	AS15-1, CS1-1	FJ618579
T. harzianum	**AS16-1**, AS17-3	FJ618580
T. harzianum	AS16-3	FJ618581
T. harzianum	AS15-4, **AS15-6**, DS203, DS322, AS16-4, BL8-5	FJ618582
T. harzianum	DS403	FJ618583
T. harzianum	SS6-2	FJ618584
T. harzianum	DS303, DS304	FJ618585
T. harzianum	AS4-1, AS4-3, AS5, AD1-1, AS2-1, AS3-3, **AS3-5**, AS12-1, **AS12-2**, AS12-3, AS12-4, AS17-2, AS19-1, **AS20-3**, AS20-4, AS20-5, AS22-2, AS22-3, AS22-4, BLP7, SS1-1, DS202	FJ618586
T. harzianum	AS15-3, AS19-3, **AS21-1**, **AS21-2**, BL3-3, BL7-5	FJ618587
T. harzianum	DS301	FJ618588
T. harzianum	DS801	FJ618589
T. harzianum	BL3-7, BLP1	FJ618590
T. virens	**AD1-3**, AS1-1, AS3-1, **AS3-4**, AS10-7, **AS16-22**, BS3-1, BS3-4, BL8-1	FJ618575
T. virens	AS3-2, **AS6-1**, AS6-4, AS10-1, AS10-5, AS11-2, AS11-4, AS14-1, AS14-3, AS17-1, AS18-1, BS1-2, BL1-5, DS509, DS901, SS8-1	FJ618576

a همه جدایه‌ها از شالیزارهای مازندران (خاک، بقایای گیاهی و اندام‌های هوایی برنج) به دست آمده‌اند. [b] از هر گروه توالی‌های یکسان، فقط یکی در بانک ژن ذخیره شد و رس‌شمار مربوطه اخذ گردید. [c] جدایه‌ها بر اساس هاپلوتیپ *tef1α* گروهبندی شده‌اند. [d] جدایه‌های بیوکنترل با قلم تیره نشان داده شده‌اند.

a All isolates obtained from rice fields in Mazandaran province, Iran. [b] From each group of identical sequences, only one representative sequence was submitted to GenBank and its accession number obtained. [c] Isolate were grouped according to their *tef1α* haplotypes. [d] Promising biocontrol isolates are printed in bold.

عامل بیماری سوختگی غلاف برنج (Naeimi *et al*. 2010a) نیز در بین قارچ‌های مورد مطالعه وجود دارند (جدول ۱). جدایه‌های خالص شده داخل لوله‌های آزمایش حاوی سیب زمینی- دکستروز- آگار (Merck, Germany PDA,) و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج DNA

جدایه‌های قارچ در تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی مخمر-دکستروز- آگار (پنج گرم عصاره مخمر، پنج گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب) که با ورقه سلوفان سترون پوشیده شده بود، کشت داده شدند. پس از ۳-۲ روز، توده میسلیومی تازه قارچ با کمک اسکالپل سترون از روی ورقه سلوفان برداشته شد و داخل هاون چینی حاوی نیتروژن مایع به خوبی خرد شد. DNA ژنومی با استفاده ازکیت GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma, USA) و بر اساس پروتکل شرکت سازنده استخراج گردید. برای اطمینان از استخراج DNA، الکتروفورز افقی ژل آگاروز ۱% حاوی اتیدیوم

بروماید در بافر Tris-Borate-EDTA ×1 انجام شد. برای هر نمونه، مقدار پنج میکرولیتر DNA استخراج شده با دو میکرولیتر رنگ 6X gel loading buffer (شامل ۴۰% سوکروز و ۰/۲۵% بروم فنول بلو) مخلوط گردید و درون چاهک‌های ژل ریخته شد. الکتروفورز در محدوده ولتاژ ۱۰۰ الی ۱۲۰ ولت انجام گرفت. پس از گذشت نیم ساعت، نتایج الکتروفورز زیر نور ماورای بنفش در دستگاه BioDoc-It System (UVP, USA) دیده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و توالی‌یابی

قطعه‌ای از ژن *tef1α* با استفاده از آغازگرهای EF1-728F (5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') و TEF-LLErev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3') (Carbone & Kohn, 1999) تکثیر شد. مخلوط واکنش در هر لوله PCR شامل پنج میکرولیتر *Taq* Buffer (10X) حاوی KCl، سه میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۶۰ میکرومول dNTPs (Invitrogen)، ۰/۲۵ میکرومول از هر یک از آغازگرها، ۰/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase (Fermentas Life Sciences) و ۸۰-۴۰ نانوگرم DNA بود. حجم نهایی مخلوط واکنش در هر لوله به ۵۰ میکرولیتر رسید (Holmes *et al*. 2004). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه T3 Thermocycler (Biometra, Germany) با شرایط زیر انجام شد: یک دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ °C و ۳۰ چرخه به صورت واسرشت سازی در ۹۴ °C (یک دقیقه)، چسبیدن آغازگرها در ۵۹ °C (یک دقیقه) و بسط در ۷۴ °C (۵۰ ثانیه) و متعاقب آن بسط نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۴ °C (Bissett *et al*. 2003).

غلظت دی ان ای ژنومی استخراج شده و قطعات تکثیر شده DNA با استفاده از دستگاه Qubit® fluorometer (Invitrogen, USA) بر حسب µg/mL تعیین شد. محصولات PCR با استفاده از کیت PCR Clean-up Kit GenElute (Sigma, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی شدند. سپس قطعات تکثیر شده برای تعیین ترادف به شرکت Macrogen در کشور کره جنوبی ارسال شدند. برای تعیین توالی، همان آغازگرهایی که در تکثیر آنها مورد استفاده واقع شده بود، به‌کار گرفته شد. کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Finch TV 1.4 (Geospiza, Inc.) بررسی شدند و در صورت نداشتن کیفیت مطلوب، نمونه‌ها مجدداً برای توالی‌یابی ارسال شدند. توالی‌ها با ابزار BankIt در بانک ژن ذخیره شدند و رس‌شمار آنها اخذ گردید. همچنین برای ارزیابی موقعیت نشانگرهای فیلوژنتیکی مختلف موجود در توالی و مقایسه آن با توالی‌های دیگر از ابزارهای *Tricho*MARK و *Tricho*BLAST (http://www.isth.info/tools/blast/index.php) استفاده شد.

محاسبه تفاوت توالی‌ها

کلیه توالی‌های به دست آمده از جدایه‌های ایرانی با نرم افزار MEGA5 و با گزینه Kimura 2-parameter دو به دو با هم مقایسه شدند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

پس از مرتب‌سازی، توالی‌های به دست آمده در این تحقیق همراه با تعدادی از توالی‌های اخذ شده از بانک ژن با نرم افزار GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997) و برنامه Clustal X (Thompson *et al*. 1997)، هم‌ردیف‌سازی و تنظیم شدند. در مواردی که توالی‌ها ۱۰۰% مشابه هم بودند، فقط یک توالی نماینده برای آنالیز نهایی و رسم

درخت فیلوژنتیک انتخاب گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار MEGA5 (Tamura *et al.* 2011) و با دو روش پیوست همسایه‌ها (Neighbor-Joining, NJ) (با گزینه‌های Maximum Composite Likelihood) و تکامل کمینه (Minimum evolution) (با گزینه‌های Maximum Composite Likelihood، Close-Neighbor-Interchange algorithm at a search level of 1) انجام شد. در هر دو روش همه جایگاه‌های دارای فضای خالی حذف شدند (Complete deletion option) یا کلیه جایگاه‌های مبهم در هر جفت توالی حذف شدند (Pairwise deletion option). آزمون اعتبارسنجی (bootstrap) در هر دو روش با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

علاوه بر این از نرم افزار PAUP 4.0b10 (Swofford 2000) نیز برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. در این روش از گزینه‌های random sequence addition، swapping algorithm = TBR، collapse option in effect، option in effect Multrees و addition sequence replicate = 10 در روش پارسمونی بیشینه (Maximum Parsimony) استفاده گردید. با توجه به ایجاد ۱۸ کلادوگرام در این روش یک کلادوگرام برآیند مورد استفاده قرار گرفت. همچنین با این نرم افزار، کلادوگرامی با روش NJ و با استفاده از گزینه Kimura's two-parameter distances نیز به دست آمد.

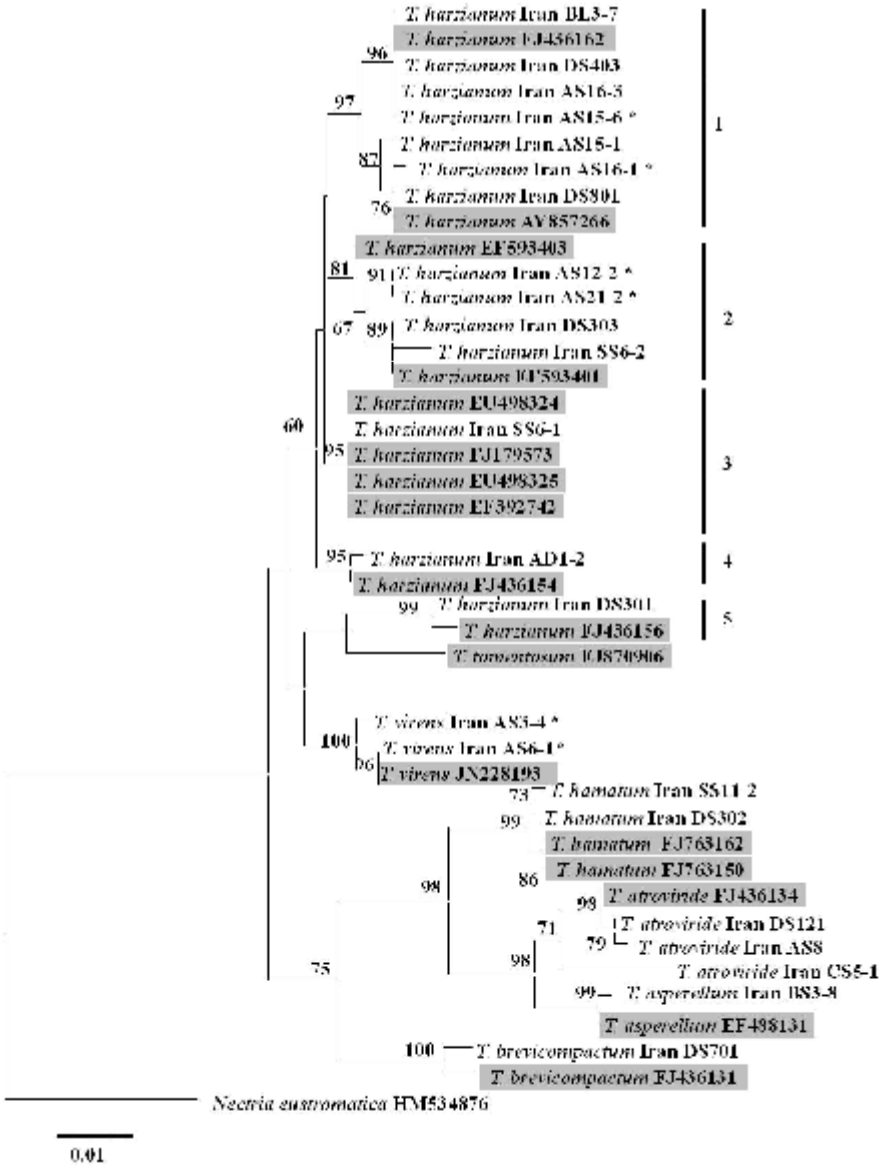
هم‌چنین تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک یک بار دیگر فقط برای نمونه‌های ایرانی با هر دو نرم افزار انجام شد. در موارد مورد نیاز گونه *Nectria eustromatica* به عنوان گروه خارجی (Outgroup) انتخاب شد.

نتیجه

طول ناحیه توالی‌یابی شده بخشی از ژن *tef1α* برای جدایه‌های *Trichoderma* در این مطالعه از ۸۰۲ جفت باز (برای جدایه AS16-1 گونه *T. harzianum*) و تا حداکثر ۸۳۱ جفت باز (برای جدایه AS8 گونه *T. atroviride*) متغیر بود. این قطعه شامل اینترون‌های چهارم (بزرگ) و پنجم (کوچک) به انضمام بخشی از اگزون ششم (بزرگ) بود. هم‌ردیف‌سازی توالی‌های نواحی *tef1α* با Clustal X نشان داد که چهارمین اینترون بزرگ بیشترین تنوع نوکلئوتیدی را دارا می باشد و یک منطقه حساس به تغییر (hot spot) را تشکیل می‌دهد (شکل ۱).

کل آرایه‌های مورد استفاده (شامل نمونه‌های مازندران، توالی آرایه‌های به دست آمده از بانک ژن و یک گونه گروه خارجی) مجموعاً ۴۲ آرایه برای بررسی فراهم کرد. وقتی برای کل آرایه‌ها از نرم افزار PAUP استفاده شد، کل صفت‌ها در جدول داده‌ها ۱۰۰۵ صفت بود که از این میان ۶۳۷ صفت ثابت، ۱۰۳ صفت غیر مفید و ۲۶۵ صفت دارای اطلاعات مفید برای تجزیه و تحلیل بود. در این روش جدول داده‌ها فقط برای نمونه‌های ایرانی همراه با یک گروه خارجی دارای ۹۳۴ صفت (شامل ۵۷۷ صفت ثابت، ۱۱۰ غیر مفید و ۲۴۷ مفید) بود. هنگام استفاده از نرم‌افزار MEGA5 وقتی از گزینه pairwise deletion option استفاده شد جدول داده‌ها دارای ۱۰۰۵ صفت بود. اما وقتی از گزینه Complete deletion option استفاده شد به دلیل حذف جایگاه‌های دارای فضای خالی، ۵۶۳ صفت (برای ۴۲ آرایه) برای بررسی باقی ماند. در این روش وقتی جدول داده‌ها فقط بر اساس نمونه‌های ایرانی و یک گروه خارجی تهیه شد ۶۷۱ صفت برای بررسی باقی ماند.

نتایج آنالیز فیلوژنتیکی با استفاده از دو نرم افزار مورد اشاره در روش بررسی بر اساس توالی‌های ژن *tef1α* جدایه‌های تریکودرمای شالیزارهای مازندران به‌علاوه



شکل ۱. فیلوگرام تکامل کمینه بر اساس توالی بخشی از ژن *tef1α* که برای جدایه‌های *Trichoderma* spp. جدا شده از شالیزارهای استان مازندران همراه با تعدادی از توالی جدایه‌های به دست آمده از بانک ژن ترسیم شده است. اعداد اعتبار سنجی (برای ۱۰۰۰ تکرار و بالای ۵۰%) روی شاخه‌ها نشان داده شده است. جدایه‌های برگرفته از بانک ژن با زمینه خاکستری و جدایه‌های بیوکنترل با ستاره نشان داده شده‌اند.

Fig. 2. A Minimum evolution phylogenetic tree based on a part of *tef1α* sequence showing the relationships among *Trichoderma* spp. isolates from Mazandaran paddy fields. Percentage bootstrap support (1000 replications; >50%) are shown above the branches. GenBank isolates are highlighted grey and biocontrol strains marked with asterisk.

توالی‌های اخذ شده از بانک داده‌ها (NCBI GenBank) تقریباً کلادوگرام‌های مشابه با تفاوت‌های اندک ایجاد کردند. شکل ۱ یک کلادوگرام به دست آمده با روش تکامل کمینه با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 را نشان می‌دهد. چهل و نُه جدایه متعلق به فراوان‌ترین گونه شالیزار یعنی *T. harzianum* ۱۴ هاپلوتیپ مختلف ژن *tef1α* را تشکیل دادند که از هر کدام نماینده‌ای انتخاب و در جدول داده‌ها مورد استفاده واقع شد. همان طور که انتظار می‌رفت این آرایه مرکب، بیشترین تنوع ژنتیکی را به نمایش گذاشت. به طوری که در شکل ۱ دیده می‌شود ۱۴ جدایه در پنج گروه قرار می‌گیرند. گروه یک، هفت جدایه (۵۰ درصد) از جدایه ها را به خود اختصاص داده است.

توالی *T. harzianum* FJ436162 و *T. harzianum* AY857266 که از بانک ژن به دست آمده‌اند با بیش از ۹۸ درصد شباهت در این گروه قرار می‌گیرند. این توالی‌ها به ترتیب مربوط به جدایه‌هایی هستند که به ترتیب از خاک اطراف مزرعه قهوه در اتیوپی (Belayneh Mulaw *et al.* 2010) و پرو (منطقه Arequipa, Inages) جدا شده‌اند (Druzhinina *et al*. 2005).

سایر گروه‌ها نیز هر کدام حداقل با یک جدایه به دست آمده از بانک ژن قرابت بسیار بالا (حداقل ۹۸ درصد، با ضریب E صفر و هم پوشانی دو توالی ۱۰۰ درصد) دارند. از میان ۱۴ جدایه *T. harzianum*، ۱۲ جدایه در یک گروه با حمایت آزمون اعتبارسنجی بوت استراپ ۶۰ درصد قرار دارند که نسبتاً حمایت پایینی است. علاوه بر این جدایه *T. harzianum* Iran DS301 از گروه اصلی فوق جدا شده و با جدایه *T. harzianum* FJ436156 از بانک ژن و همراه با گونه *T. tomentosum* FJ870906 در یک گروه قرار گرفته است که البته حمایت آزمون اعتبارسنجی بوت استراپ را ندارد (پایین‌تر از ۵۰ درصد).

با وجود این، وقتی جدایه‌های ایرانی بدون توالی جدایه‌های بانک ژن تجزیه و تحلیل شدند، نتیجه اندکی متفاوت بود (داده‌ها نمایش داده نشده‌اند). به طوری که اولاً همه جدایه‌های *T. harzianum* (حتی جدایه *T. harzianum* Iran DS301) با حمایت آزمون اعتبارسنجی نسبتاً خوب (۸۶ درصد) در یک گروه قرار گرفتند. ثانیاً همبستگی گونه *T. virens* به گونه *T. harzianum* با حمایت آزمون اعتبارسنجی حداکثر (۱۰۰ درصد) تأیید شد. شاید این موضوع به دلیل کم بودن داده‌های تجزیه و تحلیل شده باشد. با این حال، جدایه *T. harzianum* Iran DS301 هم‌چنان خیلی دورتر از سایر جدایه‌ها قرار گرفت. ماتریس درصد تفاوت توالی *tef1α* ۲۳ جدایه مربوط به شش گونه تریکودرما (داده‌ها نمایش داده نشده است) هم نشان می‌دهد که در میان جدایه‌های *T. harzianum* بیشترین تفاوت، بین جدایه *T. harzianum* DS301 و سایر جدایه‌ها دیده می‌شود.

در مطالعه قبلی که بر اساس توالی ناحیه ITS روی rDNA صورت گرفت (Naeimi *et al*. 2011)، جدایه *T. harzianum* Iran DS301 همچنان دورتر از سایر جدایه‌ها و در پایه گروه بزرگی که شامل جدایه‌های *T. harzianum* می‌شد قرار گرفت.

T. virens دومین گونه فراوان مزارع برنج مازندران با ۲۵ جدایه دارای فقط دو هاپلوتیپ *tef1α* بودند. گونه‌های *T. atroviride* و *T. hamatum* با سه و دو جدایه به ترتیب واجد سه و دو هاپلوتیپ بودند. جدایه‌های بیوکنترل سوختگی غلاف برنج متعلق به یک گونه (*T. harzianum* و یا *T. virens*) دارای هاپلوتیپ‌های *tef1α* مختلف و متفاوتی بودند.

بحث

در این تحقیق برای کسب تصویر روشن‌تری از تنوع زیستی جنس *Trichoderma* در شالیزارهای مازندران به عنوان بزرگ‌ترین استان برنج خیز کشور، فیلوژنی این جنس مهم قارچی بر اساس توالی‌های ژن *tef1α* مربوط به ۸۱ جدایه از شش گونه انجام شد. تنوع ژنتیکی در بین همه گونه‌های مورد مطالعه بارز بود، اما در این میان *T. harzianum* با ۱۴ نوع متفاوت از توالی ژن *tef1α* در مقایسه با پنج گونه دیگر، تنوع درون گونه‌ای به مراتب بیشتری نشان داد. هفت هاپلوتیپ فقط دارای یک عضو بودند و بقیه بین ۲۲-۲ عضو داشتند. مطابق نتایج تحقیق قبلی (Naeimi *et al*. 2011) این گونه با همین تعداد هاپلوتیپ ITS متنوع‌ترین گونه تریکودرما در شالیزارهای مازندران بود. نتایج این تحقیق با نتایج تحقیقات دیگر انجام شده در دنیا، که هاپلوتیپ‌های متفاوتی از ژن *tef1α* را برای این گونه معرفی کرده‌اند، همخوانی دارد. *ساموئلز و همکاران* (Samuels *et al*. 2002) بر اساس توالی ژن *tef1α*، نشان دادند که جدایه‌های *T. harzianum* سه گروه مشخص را تشکیل می‌دهند. *هویوس-کارواخال و همکاران* (Hoyos-Carvajal *et al*. 2009) سه هاپلوتیپ متفاوت *tef1α* را برای جدایه‌های این گونه در آمریکای جنوبی مشخص نمودند. *دروزینینا و همکاران* (۲۰۱۰b) هم گزارش کردند که از پنج نشانگر فیلوژنتیکی به کار رفته برای روشن شدن فیلوژنی گونه *T. harzianum*، سه مکان ژنی ناپیوسته (Unlinked loci) شامل ژن *αtef1* به حد کافی متنوع بودند.

بر اساس مطالعات محققین مختلف در سراسر دنیا *T. harzianum* فراوان‌ترین و متنوع‌ترین گونه تریکودرما در همه نقاط دنیا و در گستره وسیعی از زیستگاه‌های اکولوژیکی است (Zhang *et al*. 2005). وضعیت تاکسونومیکی این گونه، مبهم است و معیارهایی که تاکنون برای طبقه‌بندی و شناسایی سوی‌ه‌های این گونه (به خصوص آنهایی که در کنترل بیولوژیک به‌کار می‌روند) وجود دارد، تمایز کافی و مناسبی را ارائه نکرده است. *کالنیگ-گرادینگر و همکاران* (Kullnig-Gradinger *et al*. 2002) ابراز داشتند که ژنوتیپ‌های مشخص شده در این گونه، ممکن است گونه‌های جدید و یا زیرگونه باشند و ممکن است این موضوع، وجود دودمان‌های فیلوژنتیکی را اثبات کند که در حال فرایند گونه‌زایی هستند. *چاوری و همکاران* (Chaverri *et al*. 2003) گزارش کردند که این گونه شامل چندین دودمان ژنتیکی (Genetic lineages) است و در واقع گونه‌های فیلوژنتیکی پنهان را در داخل یک گونه بزرگ مورفولوژیکی نشان می‌دهد. آنها نتیجه گرفتند که این گونه رایج و همه‌جازی، یک گونه مرکب شامل دودمان‌های فیلوژنتیکی مونوفیلتیک مشخص و فاقد صفات مورفولوژیکی لازم برای تفکیک آنهاست. *دروزینینا و همکاران* (۲۰۱۰b) به این گونه لقب شیطان (Demon) داده‌اند! و بر این باورند که گونه‌زایی پیچیده‌ای در گروه گونه‌ای *H. lixii-T. harzianum* رخ داده و این گروه شامل چند گونه بیولوژیک است. آنها هم‌چنین اظهار داشتند که سویه‌های مختلف این گونه در واقع باید اعضای یکی از چندین گونه فیلوژنتیکی با میزان نوترکیبی متفاوت باشند. نوترکیبی در یک جدایه‌ی بیوکنترل تأثیر مهمی بر ثبات آن در مزرعه خواهد گذاشت. *بلازچیک و همکاران* (Blaszczyk *et al*. 2011) هم اخیراً با بررسی تنوع تریکودرما در لهستان، بر اساس توالی‌های ناحیه ITS هفت هاپلوتیپ را برای *T. harzianum* معرفی کردند.

با این توضیح، *T. harzianum* مجموعه‌ای از جدایه‌های غیر جنسی است که از نظر ساختار ژنومی،

توالی DNA و رفتار با هم فرق می‌کنند. احتمالاً جدایه‌های متفاوت ناشی از نوترکیبی بوده و بسته به فراوانی تیپ آمیزشی در یک جمعیت مشخص، به سرعت تکامل یافتند (Sharma *et al*. 2009). تنوع ژنتیکی بالا در این گونه نشان می‌دهد که مهاجرت و تولید مثل جنسی نقش مهمی را در دینامیک جمعیت بازی می‌کند (Chaverri *et al*. 2003). *هویوس-کارواخال و همکاران* (۲۰۰۹) اعتقاد دارند که فراوانی و تنوع ژنتیکی در تریکودرما با توانایی آنها در تولید متابولیت‌های مختلف و مصرف منابع متفاوت کربن آلی رابطه مستقیم دارد. نتایج این تحقیق احتمال وجود گونه‌های پنهان با مورفولوژی مشابه را در گونه *T. harzianum* تقویت می‌کند. هم‌چنین وجود تعداد زیاد هاپلوتیپ‌های *tef1α* و تنوع بالای ژنتیکی جدایه‌های *T. harzianum* شالیزارهای مازندران فراوانی بالای این گونه در این اکوسیستم را توجیه می‌کند.

با مقایسه توالی‌های ژن *tef1α* با توالی‌های ناحیه ITS (Naeimi *et al*. 2011) سویه‌های تریکودرمای شالیزار، می‌توان دریافت که توالی‌های *tef1α* سویه‌های مربوط به گونه‌های *T. atroviride* و *T. hamatum* تنوع درون گونه‌ای بیشتری دارند. به طوری که همه توالی‌های ITS این دو گونه کاملاً شبیه هم بودند اما توالی‌های *tef1α* آنها به ترتیب در سه و دو گروه قرار گرفتند. تنوع درون گونه‌ای هر دو نوع توالی در *T. harzianum* یکسان و در مورد *T. virens* این تنوع در ردیف توالی‌های *tef1α* کمتر بود. تحقیقات دیگران هم عدم همخوانی نتایج آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های *tef1α* و ITS جدایه‌های تریکودرما را نشان داده است (Hoyos-Carvajal *et al*. 2009).

بر اساس این تحقیق در یک خاک مزرعه، علاوه بر گونه‌های مختلف، هاپلوتیپ‌های مختلفی از یک گونه تریکودرما هم (بیشتر در مورد *T. harzianum*) جداسازی شدند. بنابراین، ارتباطی بین هاپلوتیپ *tef1α* و مکان جغرافیایی وجود ندارد و از یک محل نمونه‌برداری ممکن است چندین هاپلوتیپ به دست آمده باشد که در کنار هم در یک زیستگاه حضور دارند. چنین نتیجه‌گیری در مورد هاپلوتیپ‌های ITS موجود در همین زیستگاه هم صدق می‌کند (Naeimi *et al*. 2011). *غربـاوی و همکاران* (Gherbawy *et al*. 2004) هم گزارش کردند که هاپلوتیپ‌های *T. harzianum* جدا شده از خاک‌های کشاورزی منطقه دره نیل در مصر مستقل از زیستگاه هستند و ارتباطی با pH، نوع گیاه و خاک ندارند. معلوم نیست که این هاپلوتیپ‌های مختلف آیا غالباً به صورت همسانه‌ای تکثیر می‌یابند یا این که تا حدی نوترکیبی (مثلاً از طریق آناستوموز یا فرآیند پاراسکسوال) بین آنها اتفاق می‌افتد.

توالی‌های اختصاصی برای هر جدایه بیوکنترل علاوه بر مشخص کردن فیلوژنی، می‌تواند در انتخاب دقیق و استفاده تجاری آنها هم مفید باشد (Dodd *et al*. 2000). اما مطابق نتایج این تحقیق، سویه‌های آنتاگونیست مؤثر در کنترل بیولوژیک سوختگی غلاف برنج متعلق به دو گونه *T. harzianum* و *T. virens* (Naeimi *et al*. 2010a) علاوه بر این که هاپلوتیپ‌های مختلفی داشتند بلکه آنها این هاپلوتیپ را با سویه‌های غیر آنتاگونیست شریک بودند. بنابراین نمی‌توان هاپلوتیپ منحصر به فردی از *tef1α* را به خاصیت آنتاگونیسم نسبت داد. این موضوع به غیر از *T. harzianum* AS12-2 (مؤثرترین سویه) که یک هاپلوتیپ ITS مجزایی را تشکیل داد، در مورد هاپلوتیپ‌های ITS سویه‌های بیوکنترل هم صدق می‌کند (Naeimi *et al*. 2011). *هرموزا و همکاران* (Hermosa *et al*. 2000) با آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی ناحیه ITS1 هم گزارش کردند که ۱۷ سویه بیوکنترل

تریکودرما (متعلق به دو گونه *T. harzianum* و *T.viride*) در چهار گروه قرار گرفتند. *شارما و همکاران* (Sharma *et al*. 2009) تنوع ژنتیکی جدایه‌های مختلف *T. harzianum* به دست آمده از مناطق مختلف هندوستان را با تکنیک RAPD ارزیابی کردند و خاطر نشان کردند که سویه‌های بیوکنترل *Sclerotium rolfsii* در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند.

بر اساس نتایج این تحقیق، آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی *tef1α* قادر به تفکیک سویه‌های بیوکنترل تریکودرما از یکدیگر نبود. مطابق نتایج یک تحقیق مشابه که بر اساس توالی ناحیه ITS سویه‌های بومی تریکودرما صورت گرفت (Naeimi *et al*. 2011)، فیلوژنی به جز یک مورد نتوانست سویه‌های آنتاگونیست را از هم متمایز سازد. بنابراین، با توجه به اهمیت بسیار زیاد شناسایی سویه‌های بیوکنترل در مطالعات مربوط به کاربرد عوامل کنترل بیولوژیک در محیط‌های طبیعی، پیشنهاد می‌شود که فیلوژنی سویه‌های بومی شالیزار با استفاده از توالی ژن‌های دیگر به خصوص ژن‌های کدکننده آنزیم‌ها و پروتئین‌های دخیل در مکانیسم‌های بیوکنترل (مانند کیتیناز) نیز مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (68-65) متن انگلیسی مراجعه شود.