

تجزیه و تحلیل توالی مولکولی ژن ITS جهت شناسایی گونه های جداسازی شده جنس فوزاریم از مناطق مختلف ایران

امیر حسین بیکی^{۲،۱*}

۱- دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم
۲- پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه قم

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی و تمایز جنس فوزاریم در سطح گونه، برای مقاصد اپیدیمیولوژی و پاتولوژیکی ضروری است. هدف از این مطالعه بررسی روابط فیلوژنتیکی و یافتن الگوهای تکراری کلاسترشده مشخص در ناحیه ITS به منظور شناسایی گونه های متفاوت جنس فوزاریم است.

مواد و روش ها: ۱۶ جدایه از گونه های متفاوت جنس فوزاریم و از نواحی مختلف ایران جمع آوری شدند. ناحیه فاصله انداز داخلی DNA ریبوزومی توسط واکنش زنجیره ای پلی مرز تکثیر، توالی یابی و با ابزارهای مختلف مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. **یافته ها:** محصول واکنش زنجیره ای پلی مرز، قطعه های به طول به طور تقریبی ۵۵۰ جفت باز در تمام جدایه ها بود. مقایسه توالی ها و فیلوگرام حاصل از تجزیه و تحلیل ناحیه ITS، گونه های جنس فوزاریم را در ده گروه مختلف قرار داد.

بحث: ناحیه فاصله انداز داخلی بی ثبات و تغییر پذیر هستند. سطح بالای تنوع بین ناحیه فاصله انداز داخلی ناشی از حذف یا اضافه شدن واحدهای تکراری در ناحیه فوق است.

نتیجه گیری: بعضی از جدایه ها به طور قطعی شناسایی می شوند. بعضی از آن ها دارای الگوی متفاوتی هستند. وجود موتیف های خوشه شده بی همتا در ناحیه ITS یک گونه خاص نشان می دهد که این موتیف ها می توانند به عنوان یک ابزار شناسایی گونه مورد نظر به کار روند.

واژه های کلیدی: روابط فیلوژنتیکی، هم ردیف سازی، ژن ITS

مقدمه

جنس فوزاریوم یکی از جنس های مهم قارچ های رشته ای است که به طور وسیعی در خاک و گیاهان دیده می شود و دارای گسترش جهانی است که

بسیاری از آن ها موجب بیماری های مختلفی در گیاهان می شوند (۲۰). گسترش همه جانبه جنس فوزاریم به علت سازگاری در شرایط مختلف حاصل می شود (۲۲).

با توجه به این که جنس فوزاریم دارای تنوع بسیار زیادی است، شناسایی آن ها بر اساس صفات های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بسیار دشوار است. تاکسونومی جنس فوزاریوم همیشه چالش بزرگی برای تعیین گونه های مورفولوژیکی بوده است (۱۲). نشانگرها و ابزارهای مولکولی مبتنی بر آنالیز DNA، به عنوان یک راه کار مناسب در مقابل شیوه های

*آدرس نویسنده مسئول : استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم

پست الکترونیکی: amirbeiki@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۱۴

داخلی رونوشت برداری شده به اسامی ITS1 و ITS2 وجود دارد. تکثیر این نواحی به دلیل نداشتن فشار تکاملی در بررسی های فیلوژنتیکی، تاکسونومیکی و تبار شناسی مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۷). گر چه ژن های rRNA به شدت حفاظت شده می باشند، ولی توالی ناحیه ITS متغیر بوده و دارای اطلاعات مفیدی برای دسته بندی فیلوژنی محسوب می شوند. در این بررسی با بهره گیری از تجزیه و تحلیل توالی ناحیه ITS و الگوهای تکراری کلاستر شده در این ناحیه، تنوع فیلوژنتیکی گونه های مختلف جنس فوزاریوم مورد ارزیابی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه:

۱۶ جدایه از ۱۱ گونه مختلف جنس فوزاریوم از نمونه خاک های جمع آوری شده از چهار استان خوزستان، گیلان، اصفهان و زنجان با اقلیم های متفاوت جدا سازی شدند (جدول ۱).

خالص سازی جدایه ها

کلیه نمونه ها با استفاده از کشت تک هاگ خالص گردید. ابتدا با استفاده از برگ میخک سترون شده با اشعه گاما و محیط آب- آگار اقدام به تهیه محیط کشت اختصاصی CLA (Carnation Leaf Agar) شد. یک بلوک از محیط PDA (Potato Dextrose Agar) حاوی نمونه قارچی را نزدیک برگ میخک روی محیط کشت قرار داده شد. کشت های فوق به مدت ۵ تا ۷ روز در انکوباتور زیر نور ماوراءبنفش (T136w/80RsF40 BLB Philips) با فتوپریود ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. محیط فوق سبب تحریک هاگ دهی قارچ می شود. سپس یک لوله آزمایش کوچک حاوی ۵ میلی لیتر آب مقطر که توسط اتوکلاو سترون شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از یک لوپ روی سطح محیط حاوی هاگ ها

کلاسیک و به منظور بررسی وارسته های گونه های مختلف قارچ ها مورد استفاده است (۱۷،۹،۶). اکنون این ابزارهای مولکولی بر اساس مفاهیم فیلوژنتیک گونه ای برای تاکسونومی مولکولی فوزاریوم به کار می روند (۱۰،۱۲).

گونه های فیلوژنتیک به عنوان کوچک ترین دسته های قابل تشخیص موجوداتی که دارای جد مشترک هستند توصیف شده اند (۷، ۱۹). استفاده از روش های مولکولی برای مطالعه اجداد خویشاوند جهت تشخیص قارچ های غیر مرتبط ولی مشابه از نظر مورفولوژیکی کمک زیادی کرده است (۹،۱۲،۱۹). اطلاعات مولکولی، به خصوص زمانی که خصوصیت های مورفولوژیکی برای تشخیص دقیق رده بندی گروه ها کافی نیست، بسیار سودمند است (۳،۴،۱۵،۲۱). برخلاف خصوصیت های فوق، استفاده از توالی های DNA در مطالعه های روابط خویشاوندی، اطلاعات زیادی را برای موجودات مورد مقایسه فراهم می نماید. نسب شناسی چندژنی (ژن های میتوکندریایی و هسته ای) ابزار قدرتمندی را برای تشخیص گونه های فیلوژنتیکی فراهم کرده است (۸،۹،۱۲،۱۸،۱۹). توالی های ITS، rRNA، MAT، EF1- α ، Histone H3 و β -tubulin رایج ترین نشانگرهای به کار رفته برای بررسی فیلوژنی مولکولی هستند (۲،۹،۱۱،۱۹). ژن های فوق به طور معمول برای مطالعه گوناگونی درون گونه ای و برون گونه ای و تجزیه و تحلیل روابط خویشاوندی، در گستره وسیعی از یوکاریوت ها از جمله قارچ ها به کار می رود (۲،۱۰،۱۲،۱۸،۱۷،۱۹).

با استفاده از روش های معمول ریخت شناسی تفاوت های بین گونه ای را می توان تعیین نمود، ولی این روش ها نمی توانند بیان گر تفاوت درون گونه ای باشند. توالی هایی از DNA که RNA ریبوزومی را رمز می کنند، نواحی مناسبی جهت بررسی روابط خویشاوندی، تاکسونومیک و قرابت های ژنتیکی بین قارچ ها محسوب می شوند (۱۷). کلاستر ژنی rDNA شامل تکرارهای متوالی سه ناحیه اگزونی 18s، 5.8s و 28s و دو ناحیه اینترونی ITS و IGS است (۱۰). در حد فاصل بین ناحیه 18s و 28s دو قطعه فاصله انداز

کشیده و نمونه به آب مقطر داخل لوله آزمایش اضافه گردید. در مرحله بعد زیر هود و در شرایط سترون با استفاده از لوپ محتویات لوله آزمایش روی محیط آب - آگار در امتداد خطوط فرضی پخش شدند. محیط‌های فوق یک شبانه روز در داخل دستگاه انکوباتور قرار گرفتند. سپس تشتک‌ها با میکروسکوپ بررسی شدند و هاگ‌های تکی جوانه زده با دقت به محیط PDA منتقل گردیدند. بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز توده قارچی حاصل از کشت تک هاگ در سطح محیط PDA مشاهده شد.

۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع PDB (Potato Dextrose Broth) منتقل گردید. کشت‌ها روی دستگاه شیکر در دمای اتاق با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ تا ۴ روز نگهداری شدند. جمع آوری میسلیم‌ها با فیلتر کردن محیط کشت به کمک کاغذ صافی، پمپ خلاء و شستشو با آب مقطر سترون صورت گرفت. میسلیم به‌دست آمده برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت و یا این‌که در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. استخراج DNA با استفاده از روش محلول نمکی DNA انجام گرفت (۱۴).

تهیه توده میسلیومی و استخراج DNA

بلوک‌های کوچک حاوی نمونه قارچی از کشت ۶ روزه جدایه‌های قارچ روی محیط PDA به فلاسک‌های

جدول ۱- جدایه‌های مختلف شناسایی شده و شماره دسترسی آن‌ها در GenBank

شماره دسترسی	گونه	محل برداشت	شماره دسترسی	گونه	محل برداشت
HM629958	<i>acuminatum</i>	اصفهان	HM629966	<i>moniliforme</i>	گیلان
HM629959	<i>anthophilum</i>	زنجان	HM629967	<i>oxysporum</i>	گیلان
HM629960	<i>compactum</i>	خوزستان	HM629968	<i>oxysporum</i>	اصفهان
HM629961	<i>moniliforme</i>	زنجان	HM629969	<i>poape</i>	خوزستان
HM629962	<i>equiseti</i>	زنجان	HM629970	<i>proliferatum</i>	خوزستان
HM629963	<i>longipes</i>	خوزستان	HM629971	<i>solani</i>	خوزستان
HM629964	<i>moniliforme</i>	اصفهان	HM629972	<i>solani</i>	اصفهان
HM629965	<i>moniliforme</i>	خوزستان	HM629973	<i>solani</i>	گیلان

برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی، پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ (Loading buffer) شش برابر مخلوط گردید و در ژل آگارز ۰/۸ درصد بار گذاری گردید. غلظت DNA استخراج شده با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید.

تکثیر، خالص سازی و تعیین توالی قطعه-

های DNA

تکثیر ناحیه ITS1-5.8SrDNA-ITS2 با استفاده از آغازگر پیش‌رو (ITS-1-F) و آغازگر پس‌رو (-ITS-4) (جدول ۲) انجام گرفت (۱۸، ۱۶).

تکثیر	۶۸	۳۰
تکثیر نهایی	۶۸	۱۰۰

محصول واکنش PCR با استفاده از کیت خالص سازی محصول PCR (شرکت کیازن) بازیافت و خالص سازی شد. سپس محصول بازیافت شده توسط شرکت TAG Copenhagen (Denmark) تعیین توالی و پس از هم ردیف سازی موضعی (BLAST) در پایگاه GenBank ثبت گردیدند.

بررسی توالی ها

هم ردیف سازی اولیه توالی ها با استفاده از نرم افزار ClustalW انجام گرفت و سپس با استفاده از روش Maximum Likelihood با نرم افزار Mega4 تجزیه و تحلیل گردیدند. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه Mega4 طراحی شد و با کاربرد bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار استحکام یافت.

تکرارهای خوشه شده

برای یافتن موتیف های تکراری خوشه شده در توالی ITS از ابزار Repfind (<https://zlab.bu.edu>) استفاده گردید. یافتن الگوهای خوشه ای مبتنی بر p-value می باشد که نشان می دهد احتمال این که این موتیف تکراری بر حسب تصادف یافت شده است، چقدر است. در این بررسی احتمال این که الگوهای خوشه بندی شده بر حسب تصادف بوجود آمده باشند، حداکثر یک در هزار انتخاب شده است.

یافته ها

آغاز گره های به کار رفته در این بررسی قادر به شناسایی دقیق ناحیه ITS1-5.8SrDNA-ITS2 در گونه های جنس فوزاریم هستند. استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت تکثیر ناحیه فوق منجر به ایجاد قطعه ای به اندازه تقریبی ۵۵۰ جفت باز گردید (شکل ۱).

جدول ۲- توالی آغازگر ها برای تکثیر ناحیه ITS

آغازگر	توالی آغازگر
ITS-1-F	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'
ITS-4-R	5'-GCATCGATGAAGAAGAACGCAGC-3'

واکنش های زنجیره ای پلی مرز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر تیوب شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR+MgSO₄، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (با غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP ها (با غلظت ۰/۲ میلی مولار)، یک واحد از DNA پلی مرز Pfu و یک میکرولیتر از DNA قارچ (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم) تهیه گردید (جدول ۳).

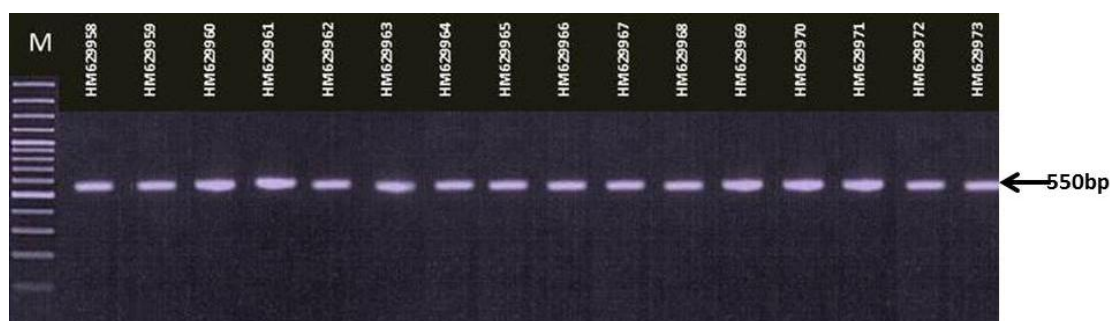
جدول ۳- مواد لازم برای انجام واکنش PCR

مواد	حجم واکنش (μl)	غلظت نهایی
آغازگر F	۱	۱۰ pmol
آغازگر R	۱	۱۰ pmol
PCR Master Mix	۱۲/۵	۱x
DNA	۱	۱۰۰ Ng
H ₂ O	۹/۵	-

تمام واکنش ها از شرکت سیناژن تهیه گردید. چرخه های PCR شامل ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به عنوان شروع واکنش، ۴۰ چرخه در دماهای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در آخر واکنش یک مرحله طویل سازی رشته به مدت ده دقیقه در ۶۸ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد (جدول ۴). محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (شکل ۲).

جدول ۴- چرخه دمایی واکنش PCR

مرحله	تعداد چرخه	دما (°C)	زمان
واسرشت سازی ابتدایی	۱	۹۴	۹۰"
واسرشت سازی		۹۴	۳۰"
اتصال	۴۰	۶۰	۳۰"

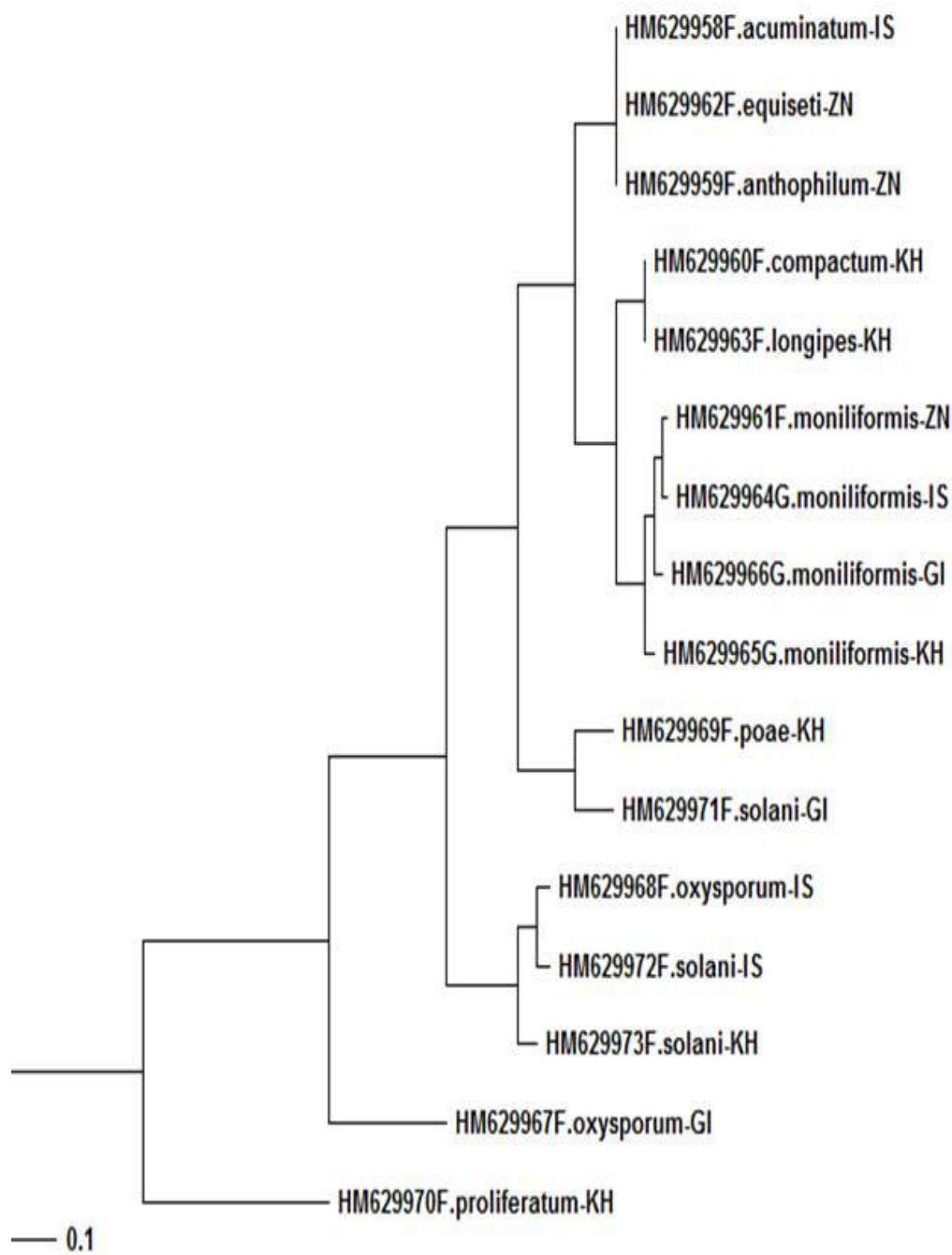


شکل ۱- محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ITS برای ۱۶ جدایه مورد بررسی به ترتیب از چپ به راست با شماره دست یابی از HM629958 تا HM629973.

به ۷ گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل سه جدایه متعلق به سه گونه مختلف *acuminatum*، *equiseti* و *anthophilum* از دو استان زنجان و گروه دوم شامل *compactum* و *longipes* هر دو از استان خوزستان هستند. گروه سوم شامل چهار جدایه از چهار استان و همگی از گونه *moniliforme* هستند. گروه چهارم شامل *poae* و *solani* از دو استان خوزستان و گیلان و گروه پنجم شامل *oxyssporum* و *solani* از دو استان اصفهان و گیلان هستند. دسته ششم و هفتم هر کدام با یک جدایه به ترتیب با گونه-های *oxyssporum* از گیلان و *proliferatum* از خوزستان هستند.

بررسی توالی‌ها:

پس از تعیین توالی‌های به دست آمده از ناحیه ITS، توسط ClustalW هم‌ردیف شدند. نتایج هم‌ردیف سازی (شکل ۱ ضمیمه) و ماتریس شباهت‌ها (جدول ۲ ضمیمه) نشان می‌دهد، بیش‌ترین شباهت بین جدایه *acuminatum* از استان اصفهان با جدایه‌های *Equiseti* و *anthophilum* از زنجان هست. کم‌ترین شباهت مربوط به جدایه‌های *oxyssporum* از گیلان و *proliferatum* از خوزستان است. فیلوگرام به دست آمده در شکل ۲ قابل رویت است. این فیلوگرام نشان می‌دهد که جدایه‌های مورد تحقیق



شکل ۲- روابط خویشاوندی جدایه های جنس فوزاریوم بر اساس توالی ناحیه ITS به روش Maximum Likelihood

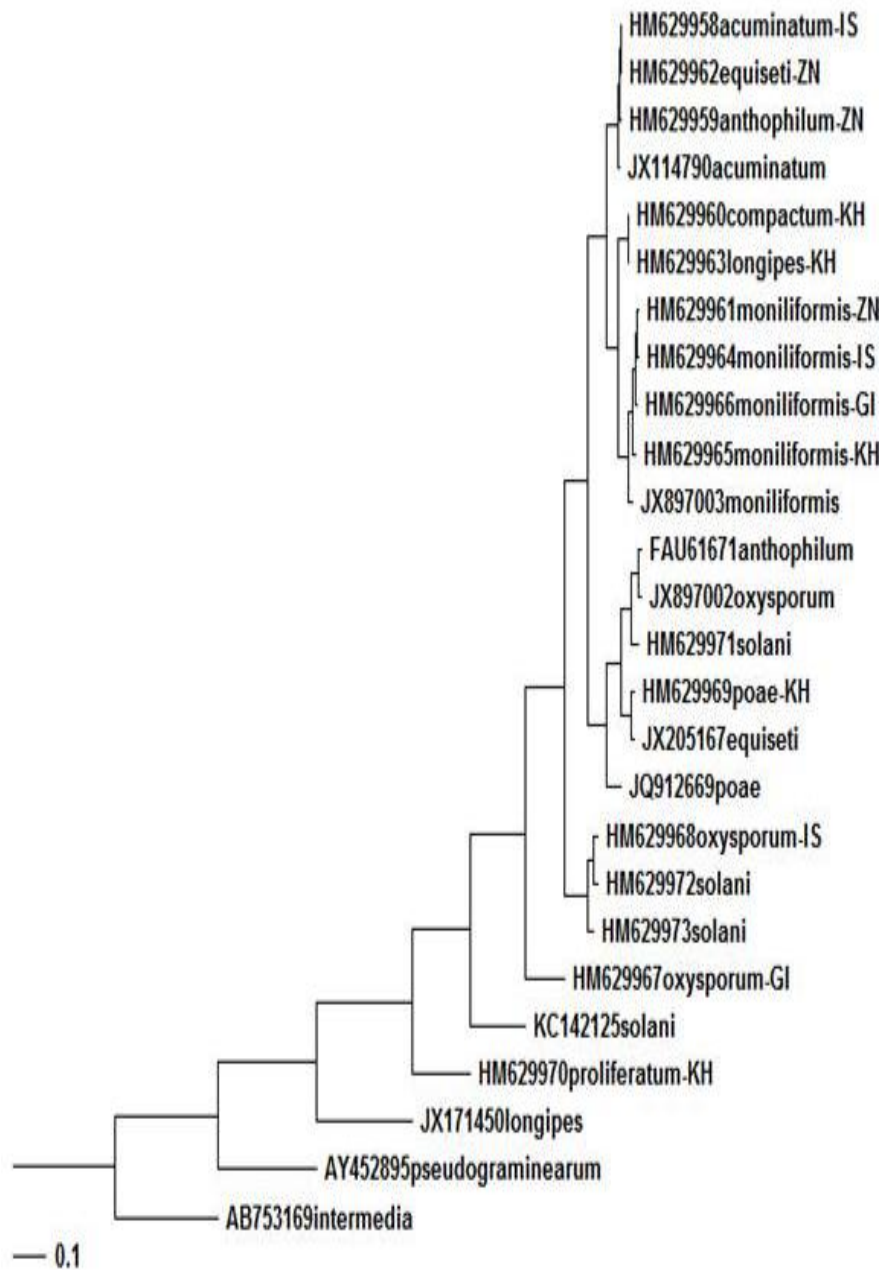
تکرارهای خوشه شده

نتیجه بررسی الگوهای تکراری خوشه شده نشان می دهد، ۳ نسخه از موتیف GAAT در همه گونه ها به جزء گونه *moniliform* و *proliferatum* دیده

می شود. الگو TAG فقط در گونه *solani* جمع آوری شده از استان خوزستان مشاهده می شود. در گونه فوق نیز ۳ نسخه از این الگو تکرار شده است. موتیف TGGTATT با خوشه سه تکراری، موتیف TTA با ۶ نسخه کلاستر شده، الگوی GAA با ۷ نسخه کلاستر

۳ تکرار خوشه شده در ناحیه ITS فقط گونه های *solani* و *oxysporum* اصفهان دیده می شود. توالی ۴ تایی TTGG نیز در گونه های *acuaminatum* و *equiseti* وجود دارد (جدول ۲).

شده و الگوی TTTAATTA با دو نسخه تکراری فقط در گونه *proliferatum* مشاهده می شود (شکل ۴). خوشه ۳ تکراری GTGAA فقط در گونه *moniliforme* دیده می شود. موتیف TGT TTTT با



شکل ۳- درخت روابط خویشاوندی جدایه های جنس فوزاریوم مورد بررسی و توالی های منتخب از پایگاه GenBank بر اساس توالی ناحیه ITS به روش Maximum Likelihood

بحث

در این تحقیق ۷۰ جدایه قارچی حاصل از تک هاگها بدست آمد. جدایه های جنس فوزاریوم جهت تشخیص گونه مورد بررسی دقیق تر قرار گرفتند و بر اساس کلید شناسایی اوکوبو و همکاران (۱۳)، ۱۱ گونه مختلف شناسایی و در مجموع ۱۶ جدایه برای بررسی مولکولی انتخاب گردیدند (جدول ۱).

بررسی فیلوگرامها (شکل ۳ و ۴) نشان می دهد که جدایه های مناطق جغرافیایی مختلف، علی رغم این که به گونه های متفاوتی تعلق دارند، تا حدودی در کنار هم قرار گرفته اند. این مطلب می تواند مؤید این نظر باشد که در استان های مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی مختلف زیرگونه های متفاوتی امکان ظهور و بروز می یابند. تنها گروهی که همگی به یک گونه تعلق دارند گروه سوم است که نشان می دهد که گونه فوق دارای تنوع کمتری نسبت به سایر گونه های مورد بررسی است و یا زیر گونه های کمتری ظهور و بروز یافته است. با توجه به شرایط آب و هوایی به طور کامل متفاوتی که در استان های مورد بررسی وجود دارد می توان گفت: شرایط آب و هوایی متفاوت سبب تنوع گونه *moniliforme* نمی تواند باشد. با توجه به این که تمام نمونه های استان گیلان در گروه های مختلف قرار دارند، می توان چنین نتیجه گرفت که شرایط آب و هوایی استان در گونه های مختلف سبب تغییرهای غیر یکسان و با دامنه وسیع تری می شود. با توجه به تهیه نمونه از خاک، ممکن است بافت خاک نیز در ایجاد تنوع بیش تر مؤثر باشد. جدایه *proliferatum* با توجه به اینکه به تنهایی در یک گروه واقع شده، شباهت کمتری با سایر گونه ها می تواند داشته باشد. داده های ریخت شناسی نیز این موضوع را تأیید می کند.

جدول ۵- موتیف های بسیار معنی دار و تعداد خوشه ها یافت شده در گونه های مختلف جنس فوزاریوم همراه با P-Value

موتیف	گونه	تعداد خوشه	p-Value
GAAT	<i>Proliferatum*</i>	۴	۰/۰۰۰۳۵۶
GAAT	<i>Moniliforme*</i>	۴	۰/۰۰۰۲۳۹
GTGAA	<i>moniliforme</i>	۳	۰/۰۰۰۰۸۱
TAG	<i>solani</i>	۳	۰/۰۰۰۵۴۲
TGGTATT	<i>proliferatum</i>	۳	۰/۰۰۰۱۸۲

۰/۰۰۳۴۱۰	۲	<i>solani</i>	TGTTTT
۰/۰۰۰۳۵۹	۲	<i>oxysporum</i>	TGTTTT
۰/۰۰۰۳۶۲۰	۶	<i>proliferatum</i>	TTA
۰/۰۰۰۳۶۲۰	۴	<i>equiseti</i>	TTGG
۰/۰۰۰۳۶۲	۴	<i>accuminatum</i>	TTGG
۰/۰۰۰۹۰۷	۲	<i>proliferatum</i>	TTTAATTA

* در سایر گونه ها به جز این دو گونه مشاهده می شود

جدایه های *solani* استخراج شده از استان های اصفهان و خوزستان با جدایه *oxysprom* استخراج شده از استان اصفهان خویشاوندی نزدیکتری دارند تا جدایه *oxysporum* استخراج شده از استان گیلان. اتحاد جدایه های گونه *moniliforme* با گونه های *compactum* و *longipes* نشانه خویشاوندی این سه گونه می تواند باشد. وجود تشابه ها و رابطه خویشاوندی بین جدایه های مورد بررسی می تواند نشانگر رفتار بیماری زایی فوزاریوم های مختلف را بازتاب دهد و با توجه به گسترش جهانی جنس فوزاریوم، پراکنش آن ها می تواند با گونه های گیاهی خاص نیز مرتبط باشد.

جهت بررسی این نکته که جدایه های مورد آزمایش با کدام گونه منتخب (توالی های ثبت شده در پایگاه GenBank) شباهت بیش تری دارند، اقدام به هم-ردیف سازی توالی های فوق با توالی های استاندارد موجود در داده پایگاه انجام شد. هم ردیف سازی فوق (شکل ضمیمه ۲) و ماتریس شباهت ها (جدول ضمیمه ۲) نشان می دهد جدایه های مورد بررسی کمترین شباهت را با توالی های AB753169 از گونه *intermedia* ، JX171450 از گونه *longipes* و AY452895 از گونه *pseudograminearum* و بیش ترین شباهت را با JX114790 از گونه *acuminatum* و JX897002 از گونه *oxysporum* دارند. سطح بالای تنوع بین ITS ناشی از حذف یا اضافه شدن واحدهای تکراری در ناحیه فوق است که از نظر وجود تنوع با نتایج به دست آمده از تحقیق های قبلی یکسان است (۱۱، ۱۲، ۱۳، ۲۲) اما از نظر تمایز بین گونه ها با نتایج حاصل از بررسی های مورفولوژیک مطابقت ندارد.

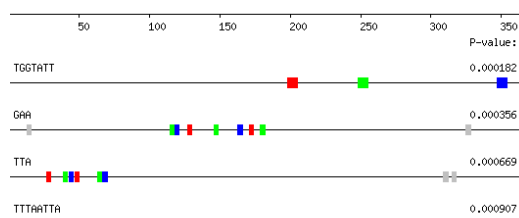
روابط خویشاوندی بین جدایه های مورد بررسی و نمونه های منتخب در شکل ۴ قابل رویت است. این

بین ۳۳ تا ۵۰ درصد خطای تشخیص وجود دارد، به-طوری که تا اواخر قرن بیستم، اکثر جدایه های فوزاریم مطالعه شده توسط پاتولوژیست ها اشتباه تشخیص داده می شدند (۱۰). به هر حال استفاده از خصوصیت های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی زمان بر بوده و تنها متخصصین ماهر قادر به شناسایی گونه های جنس فوزاریم هستند (۵). با توجه خطای بالای شناسایی و تمایز گونه ها و با ملاحظه نتایج بررسی فوق، به نظر می رسد نحوه تعیین گونه های جنس فوزاریم بر اساس شیوه های کلاسیک نیازمند تجدید نظر جدی است. به عبارت بهتر توصیه می شود، شناسایی گونه ها از طریق سیستم توامان مولکولی و کلاسیک انجام پذیرد. در سالهای اخیر علی رغم وجود روش های پیشرفته، نیاز به روش های سریع، قابل اعتماد و دقیق مولکولی مبتنی بر DNA احساس می شود.

وجود موتیف های خوشه شده بی همتا در ناحیه ITS یک گونه خاص نشان می دهد که این موتیف ها می توانند به عنوان یک ابزار شناسایی گونه مورد نظر به کار روند. این شیوه می تواند مکمل روش-PCR RFLP برای شناسایی گونه های جنس فوزاریم استفاده شود که در آن محصول PCR با آنزیم های محدود کننده برش یافته و روی ژل تفاوت باند ایجاد شده گونه ها را از هم متمایز می سازد.

در حال حاضر تمایز و شناسایی گونه های جنس فوزاریم بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی انجام می گیرد. تعیین یک گونه ممکن است بر اساس تفاوت تنها یک خصوصیت باشد (۲). در این مطالعه راه کاری پیشنهاد می شود که بتوان با دقت و حساسیت بسیار بالا گونه های جنس فوزاریم را شناسایی نمود. برای این منظور پیشنهاد می شود که با تکثیر ناحیه ITS، توالی یابی آن و سپس هم ردیف سازی آن با توالی های شناخته شده، نزدیک ترین توالی را با توالی مورد نظر بازیابی نمود. هم ردیف سازی می تواند به آسانی تفاوت دو توالی نزدیک به هم را نشان دهد. هم چنین فرصتی را برای برگشتن و بررسی مجدد هر ناحیه چند شکلی را برای خطاهای بازی فراهم می سازد و استنتاجاتی را به وجود می آورد که بسیار قوی تر از آنالیزهای رایج

فیلوگرام وجود ۱۱ گروه را مشخص می کند. به جز گروه سوم که همه به گونه *moniliforme* تعلق دارند، عناصر بقیه گروه ها از گونه های متفاوت تشکیل شده اند. می توان چنین نتیجه گیری کرد که گونه فوق تنوع کمتری داشته ولی سایر گونه های مورد بررسی در این تحقیق هم در داخل و هم در سطح جهانی دارای تنوع بیشتری هستند. همه نمونه های مربوط به گونه *acuminatum* در گروه اول همراه با جدایه های متعلق به دو گونه مختلف *anthophilum* و *equiseti* قرار گرفته اند. دوباره گروه دوم شامل دو جدایه از *compactum* و *longipes* هستند. گروه چهارم شامل گونه های متفاوت *anthophilum*، *oxysporum*، *poae* و *solani* هستند. دو جدایه از گونه *solani* در گروه پنجم همراه با یک جدایه از گونه *oxysporum* دیده می شوند. دسته های ششم تا یازدهم نیز هر کدام با یک جدایه گروه بندی شده اند. جدایه های داخلی در مقایسه با جدایه های خارجی تمایل بیشتری دارند تا در یک گروه قرار گیرند.



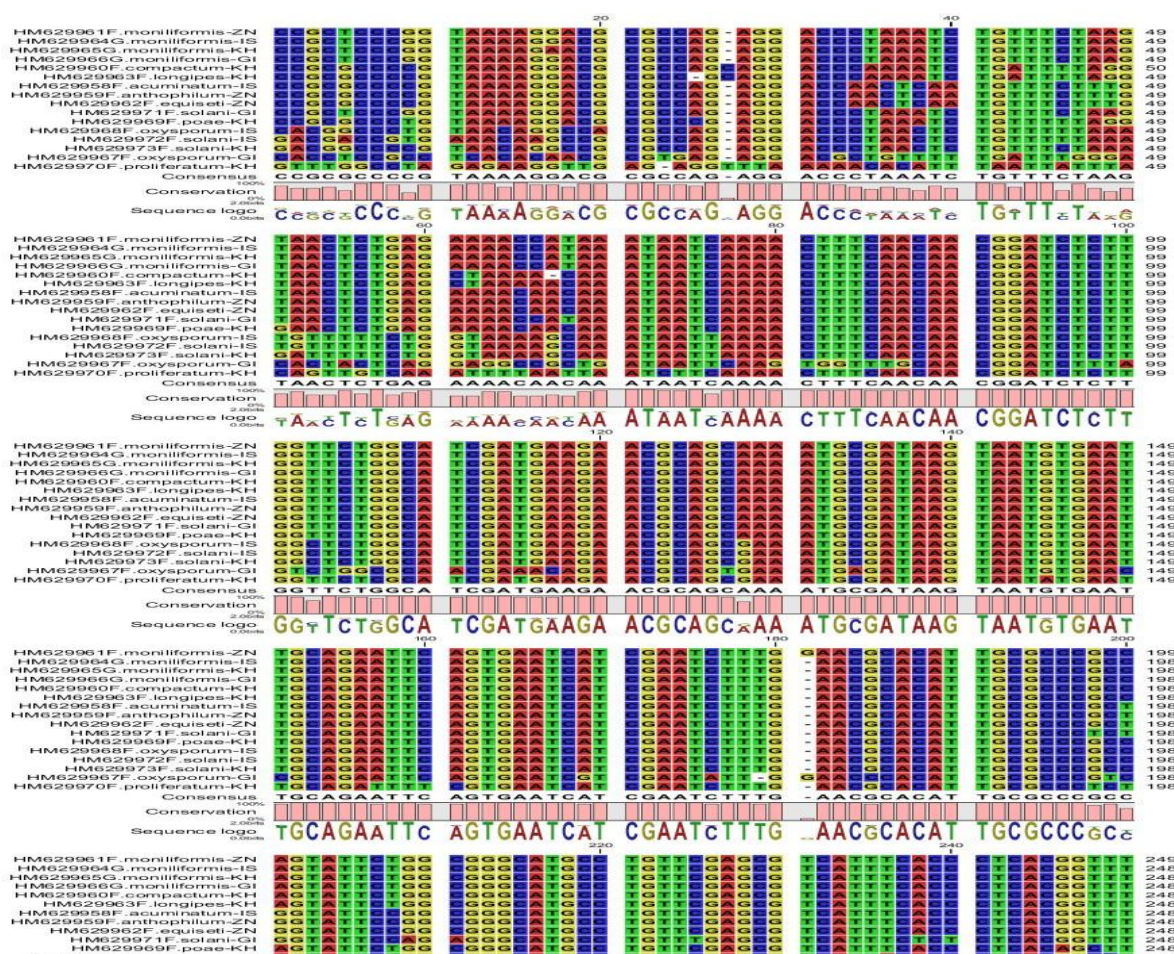
شکل ۴- موتیف های مختلف معنی دار در توالی گونه *proliferatum*

نتیجه گیری

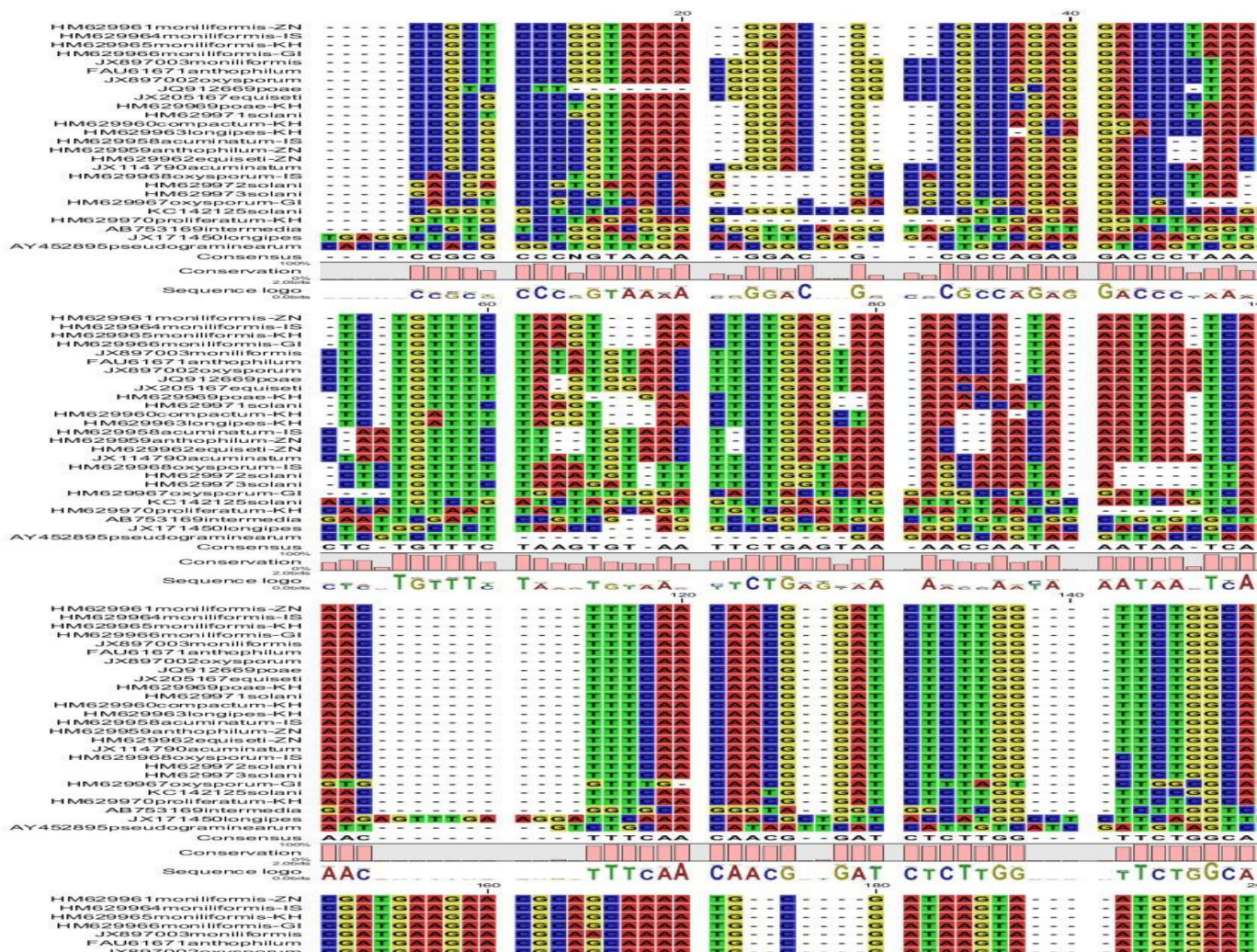
شرایط متفاوت آب و هوایی و خاک می توانند سبب تنوع گونه ها شوند. در بعضی از استان ها مثل گیلان، شرایط آب و هوایی، سبب تغییرهای غیریکسان و با دامنه وسیع تر می شود.

فوزاریم یکی از جنس های بسیار گسترده و پیچیده قارچی است که اکثر جدایه های آن را نمی توان فقط با سیستم تشخیص کلاسیک و مرسوم به درستی تشخیص داد (۵،۲۲). در شیوه کلاسیک به طور معمول

است. قدرت این استنباطها به میزان توالی قابل دسترس و میزان محتوی اطلاعات سودمند دارد. اگر توالی مورد بررسی با یک توالی استاندارد ثبت شده مطابقت کامل داشته باشد یا تطابق بسیار بالایی داشته باشد، جدایه مورد نظر شناسایی شده است. در چنین حالتی پلی مورفایسم نوکلئوتیدی اندکی دیده می شود. در این موارد، با هم ردیف سازی و کلیدهای مورفولوژیکی می توان شناسایی گونه جنس فوزاریم را انجام داد. برای تأیید گونه شناسایی شده آنالیز فیلوژنتیکی توالی ITS هم زمان با توالی ژن های رمز کننده پروتئین غنی از اینترون توصیه می شود. متأسفانه به علت نداشتن پایگاه اطلاعاتی دقیق و کمبود یا نبود اطلاعات مورفولوژیکی و مولکولی بعضی از گونه ها، امکان شناسایی گونه های جنس فوزاریم با چالش بزرگی روبرو است.



شکل ۱ - همریف سازی جدایه های مورد بررسی



شکل ۲ ضمیمه- همدریف سازی جدایه های مورد بررسی همراه با توالی های منتخب

جدول ۱ ضمیمه - ماتریس شباهت ها برای جدایه های مورد بررسی

	HM629958	HM629962	HM629959	HM629960	HM629963	HM629961	HM629964	HM629965	HM629966	HM629968	HM629972	HM629973	HM629969	HM629971	HM629967	HM629970
HM629958		100	100	92	92	91	92	92	91	84	84	86	87	87	74	64
HM629962	100		100	92	92	91	92	92	91	84	84	86	87	87	74	64
HM629959	100	100		91	91	91	92	92	91	85	85	86	88	87	74	64
HM629960	92	92	91		99	93	94	94	93	86	86	87	89	87	75	63
HM629963	92	92	91	99		93	94	94	93	86	86	87	89	87	75	63
HM629961	91	91	91	93	93		99	98	98	86	84	86	90	90	76	63
HM629964	92	92	92	94	94	99		99	98	86	86	88	90	91	76	63
HM629965	92	92	92	94	94	98	99		97	86	86	88	90	91	77	63
HM629966	91	91	91	93	93	98	98	97		88	86	88	90	91	78	63
HM629968	84	84	85	86	86	86	86	86	88		97	96	86	83	81	62
HM629972	84	84	85	86	86	84	86	86	86	97		97	84	81	81	62
HM629973	86	86	86	87	87	86	88	88	88	96	97		86	83	82	62
HM629969	87	87	88	89	89	90	90	90	90	86	84	86		92	75	62
HM629971	87	87	87	87	87	90	91	91	91	83	81	83	92		72	65
HM629967	74	74	74	75	75	76	76	77	78	81	81	82	75	72		53
HM629970	64	64	64	63	63	63	63	63	63	62	62	62	62	65	53	

تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی دوره هشتم شماره سی ام - تجزیه و تحلیل ..

جدول ۲ ضمیمه- ماتریس شباهت ها برای جدایه های مورد بررسی و جدایه های منتخب

	HM629958	HM629962	HM629959	HM629960	HM629963	JX114790	FAU61671	JX897002	HM629961	HM629964	HM629969	JX205167	HM629965	JX897003	HM629966	HM629968	HM629972	HM629973	HM629971	JQ912669	HM629967	KC142125	HM629970	AY452895	AB753169	JX171450
HM629958	100	100	100	94	94	99	88	87	93	94	89	88	94	92	93	87	87	88	88	85	76	70	69	45	41	45
HM629962	100	100	100	94	94	99	88	87	93	94	89	88	94	92	93	87	87	88	88	85	76	70	69	45	41	45
HM629959	100	100	100	94	94	98	88	87	93	94	89	89	94	92	93	87	87	88	88	85	76	70	69	45	41	45
HM629960	94	94	94	100	100	93	89	89	94	95	90	90	94	94	93	87	87	88	88	87	78	69	69	44	42	44
HM629963	94	94	94	100	100	93	89	89	94	95	90	90	94	94	93	87	87	88	88	87	78	69	69	44	42	45
JX114790	99	99	98	93	93	100	86	86	92	92	87	87	93	91	91	86	86	87	86	84	75	68	67	43	40	44
FAU61671	88	88	88	89	89	86	100	99	92	92	94	95	92	93	91	85	84	85	95	91	75	65	65	42	40	44
JX897002	87	87	87	89	89	86	99	100	92	91	95	95	91	92	91	86	84	85	96	91	75	65	65	41	39	44
HM629961	93	93	93	94	94	92	92	92	100	99	91	90	98	98	99	89	87	88	91	87	78	68	68	43	42	45
HM629964	94	94	94	95	95	92	92	91	99	100	91	90	99	98	98	88	88	89	90	87	78	69	68	44	42	45
HM629969	89	89	89	90	90	87	94	95	91	91	100	98	90	89	91	87	85	86	92	93	76	68	64	43	39	45
JX205167	88	88	89	90	90	87	95	95	90	90	98	100	90	90	90	85	84	86	92	92	76	67	65	42	39	44
HM629965	94	94	94	94	94	93	92	91	98	99	90	100	100	97	97	88	88	90	90	87	79	69	68	43	42	45
JX897003	92	92	92	94	94	91	93	92	98	98	89	90	97	100	97	87	85	87	89	87	77	67	66	42	40	44
HM629966	93	93	93	93	93	91	91	91	99	98	91	90	97	97	100	90	88	90	90	87	80	69	68	44	42	45
HM629968	87	87	87	87	87	86	85	86	89	88	87	85	88	87	90	100	97	96	85	82	82	70	64	44	41	45
HM629972	87	87	87	87	87	86	84	84	87	88	85	84	88	85	88	97	100	97	83	81	82	69	64	44	41	44
HM629973	88	88	88	88	88	87	85	85	88	89	86	86	90	87	90	96	97	100	84	83	82	70	64	43	41	44
HM629971	88	88	88	88	88	86	95	96	91	90	92	92	90	89	90	85	83	84	100	88	74	68	69	42	40	46
JQ912669	85	85	85	87	87	84	91	91	87	87	93	92	87	87	87	82	81	83	88	100	73	65	64	44	38	43
HM629967	76	76	76	78	78	75	75	75	78	78	76	76	79	77	80	82	82	82	74	73	100	59	57	40	38	41
KC142125	70	70	70	69	69	68	65	65	68	69	68	67	69	67	69	70	69	70	68	65	59	100	60	37	37	37
HM629970	69	69	69	69	69	67	65	65	68	68	64	65	68	66	68	64	64	64	69	64	57	60	100	38	38	39
AY452895	45	45	45	44	44	43	42	41	43	44	43	42	43	42	44	44	44	43	42	44	40	37	38	100	31	29
AB753169	41	41	41	42	42	40	40	39	42	42	39	39	42	40	42	41	41	41	40	38	38	37	38	31	100	32
JX171450	45	45	45	44	45	44	44	44	45	45	45	44	45	44	45	45	44	44	46	43	41	37	39	29	32	100

جدول ضمیمه ۳ -الگو های بسیار معنی دار و تعداد تکرار آنها در توالی ITS در گونه های مختلف جنس فوزاریوم

موتیف	گونه فوزاریوم	acuminatum	anthophilum	compactum	Fusarium sp	equiseti	longipes	moniliforme	moniliforme	moniliforme	moniliforme	oxysporum	poae	proliferatum	solani	solani	solani
AAC		6	6	0	0	6	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
AAT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	6	6
CAA		5	5	0	5	5	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0
GAA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	0	7	0	8	8
GAAT		4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	4	4	0	4	4	4
GTA		0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	0	0	3	0	0
GTGAA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
TAG		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
TGGTATT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
TGTTTTT		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
TTA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0
TTGG		4	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TTTAATTA		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0

منابع

۱. بیکی ا، جهانشاهی ا، صفایی ن احمدی ج. بررسی روابط فیلوژنتیکی قارچ *Fusarium graminearum* sensu lato در ایران با استفاده از آنالیز توالی MAT. ۱۳۸۹. ژنتیک نوین: ۳(۱۵): ۹۳-۹۸.
2. Brasileiro B T R V, Coimbra M R M, Morais Jr, M A d, Oliveira N T. Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-fingerprinting based on PCR markers. *Braz J Microbiol.* 2004; 35(3): 205-210.
3. Bruns TD, White T J, Taylor J W. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Evol Syst.*1991; 22 : 525-564.
4. Gardiner DM, Kazan K Manners JM. Nutrient profiling reveals potent inducers of trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol.* 2009; 46: 604-613.
5. Geiser D M, del Mar Jiménez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward T J, Zhang N, Kulda G A, O'Donnell, K. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.* 2004; 110: 473-479.
6. Goswami R S, Kistler H C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology.* 2004; 5(6): 515-525.
7. Lattanzio V M, Visconti A, Haidukowski M, Pascale M. Identification and characterization of new *Fusarium* masked mycotoxins, T2 and HT2 glycosyl derivatives, in naturally contaminated wheat and oats by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2012; 47(4): 466-475.
8. Leslie J F, Summerell B A. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell publishing. 2006
9. Llorens A, Hinojo M, Mateo R, Gonzalez-Jaen M, Valle-Algarra F, Logrieco A, Jiménez M. Characterization of *Fusarium* spp. isolates by PCR-RFLP analysis of the intergenic spacer region of the rRNA gene (rDNA). *Int J Food Microbiol.* 2006; 106(3): 297-306.
10. O'Donnell K, Humber R A, Geiser D M, Kang S, Park B, Robert V A, Crous P W, Johnston P R, Aoki T, Rooney A P, Rehner S A. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* MLST. *Mycologia.* 2012; 104(2): 427-445.
11. O'Donnell K, Sutton D A, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi M G, Brandt M E, Zhang N, Geiser D M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(8): 2477-2490.
12. O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, Corby Kistler H, Aoki T. Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genet Biol.* 2004; 41(6): 600-623.
13. Okubo Y, Shinozaki M, Wakayama M, Nakayama H, Sasai D, Ishiwatari T, Nemoto T, Naobumi T, Shibuya K. Applied gene histopathology: identification of *Fusarium* species in FFPE tissue sections by in situ hybridization, *Fungal Diagnostics.* Springer 2013. 141-147.
14. Richardson M D, Warnock D W. Fungal infection: diagnosis and management: John Wiley and Sons. 2012.
15. Salazar O, Julian M, Rubio V. Primers based on specific rDNA-ITS sequences for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG 2 subgroups and ecological types, and binucleate *Rhizoctonia*. *Mycol Res.* 2000; 104(03): 281-285.
16. Sangalang A, Burgess L, Backhouse D, Duff J, Wurst M. 1995. Mycogeography of *Fusarium* species in soils from tropical, arid and mediterranean regions of Australia. *Mycol Res.* 1995; 99(5): 523-528.
17. Sever Z, Ivic D, Kos T, Milicevic T. Identification of fusarium species isolated from stored apple fruit in croatia. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2012; 63(4): 463-470.
18. Taylor J W, Jacobson D J, Kroken S, Kasuga T, Geiser D M, Hibbett D S, Fisher M C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol.* 2000; 31(1): 21-32.
19. White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols :a guide to methods and applications.* 1990; 18: 315-322.
20. Worrall J J. Structure and dynamics of fungal populations. Springer.1999.
21. Yun S-H, Arie T, Kaneko I, Yoder, O, Turgeon B G. Molecular Organization of Mating Type Loci in Heterothallic ,Homothallic, and Asexual Gibberella *Fusarium* Species. *Fungal Genet Biol.* 2000; 31(1): 7-20.
22. Zarrin M, Ganj F, Faramarzi S. Analysis of the rDNA internal transcribed spacer region of the *Fusarium* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Biomed Rep.*2016; (4): 471-474.