

بررسی فیلوژنی گونه مرکب *Verticillium epiphytuim*

سید محمد رضا موسوی^۱، رسول زارع^۲

چکیده:

گونه *V. epiphytuim* یکی از چندین تاکسون شبه-ورتیسیلیوم است که تشخیص آن دشوار بوده و تا زمانی که اطلاعات بیشتری به دست آید در جنس "*Verticillium*" قرار داده شده است. بر اساس توالی ITS گونه *V. epiphytuim* تا حدی به گونه‌های جنس *Pochonia* نزدیک است. آزمون‌های ریخت شناسی، توانایی رشد در دماهای مختلف (از 12 تا 36°C درجه سانتی‌گراد با افزایش 3 درجه‌ای) و فیلوژنی گونه *V. epiphytuim* در تمام جدایه‌های در دسترس از ایران و سایر کشورهای جهان بر اساس توالی ناحیه ITS ژنوم و ژنهای TEF، β -tubulin و کالمودولین بررسی شدند که بر اساس مطالعات ریخت شناسی و مولکولی جدایه‌های مختلف گونه *V. epiphytuim* را می‌توان در سه گروه که احتمالاً سه گونه مجزا هستند قرار داد.

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت

2- موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش رستنیها، اوین، تهران

مقدمه:

از میان گونه‌های بخش *Prostrata* که بر اساس توالی DNA مشخص شدند، *Verticillium epiphytum* در هیچکدام از جنس‌های *Pochonia* یا *Lecanicillium* قرار نگرفته و جزء گونه‌های طبقه بندی نشده در نظر گرفته می‌شود که تاکسونومی آنها نیاز به مطالعات تکمیلی دارد (Zare and Gams, 2004; Zare et al., 2001). پرگنه‌های این قارچ دارای رشد نسبتاً سریع است که قطر آن در مدت 10 روز به 15-30 میلی‌متر می‌رسد. کم‌رشد، سفید، که رنگ آن از زیر ظرف پتری زرد تا زرد مایل به شیری با سایه‌های قهوه‌ای رنگ می‌باشد. اغلب جدایه‌ها تولید رنگدانه زرد رنگ می‌کنند که در آگار پخش می‌شود. ریشه‌ها بی‌رنگ و دیواره‌دار، فیالیدها نسبتاً بلند و معمولاً منفرد، که روی ریشه‌های تمایز نیافته قرار دارند و تولید سر کنیدی کروی یا بیضوی می‌کند. کنیدی‌ها داسی شکل با انتهای تخت و معمولاً یک سلولی هستند. میکروکنیدی وجود ندارد و در بیشتر جدایه‌ها کلامیدوسپورها هر چند به تعداد کم وجود دارند. کلامیدوسپور انتهایی معمولاً یک سلولی، کروی تا نیمه کروی، لوبیایی شکل یا کمی در وسط منقبض شده، گاهی اوقات کمی خمیده و دارای یک دیواره که سلول دوم کوچک است، شفاف، دارای دیواره ضخیم با سطح زبر و رنگدوست (chromophilic) است. کریستال بسته به جدایه ممکن است وجود داشته باشد. بهینه دمایی (27-)-24 درجه سانتی‌گراد بوده در دمای 33 درجه هیچ رشدی صورت نمی‌گیرد (Zare and Gams, 2004).

این قارچ در گذشته فقط در ارتباط با قارچ‌های مولد زنگ گزارش شده بود (Zare and Gams, 2004) تا اینکه در ایران از نماتود سیست چغندر قند در استانهای خراسان رضوی (Zare and Fatemy, 2004) و آذربایجان شرقی (زارع، اطلاعات منتشر نشده) جدا گردید.

Gams (1971) گونه *V. epiphytum* را *Verticillium psalliotae* نامید. اگرچه *V. epiphytum* به واسطه کنیدیهای با انتهای تخت که در سرهای کروی قرار دارند، ریشه‌ها و فیالیدهای پهن‌تر، فیالیدهای طویل‌تر، وجود کلامیدوسپورهای انتهایی و عدم ترشح رنگدانه قرمز در

آگار قابل تشخیص است. ویژگیهای مشابه این قارچ را از تمام گونه‌هایی که قبلا شرح داده شدند تفکیک می‌کند. بر اساس اطلاعات توالی ITS گونه *V. epiphytum* تا حدی به گونه‌های جنس *Pochonia* نزدیک است. با توجه به توالی LSU + SSU به مقدار کافی از *Pochonia* مجزا بوده و با آن منوفیلیتیک نیست (Zare and Gams, 2004; Sung *et al.*, 2007). از آنجا که اطلاعات بیشتری وجود ندارد و وضعیت فیلوژنی این گونه به خوبی مشخص نیست، زارع و گمس (2004) از رده‌بندی رسمی خودداری کردند. این گونه یکی از چندین تاکسون شبه ورتیسیلیوم است که تشخیص آن مشکل بوده و تا زمانی که اطلاعات بیشتری به دست آید در جنس "*Verticillium*" قرار خواهد داشت (Zare and Gams, 2004).

مواد و روش‌ها:

قارچ‌های استفاده شده

در این آزمایش تعداد 12 نمونه‌ی ایرانی و خارجی موجود این قارچ در مجموعه CBS (مرکز قارچ‌شناسی هلند) و مجموعه قارچ‌های زنده ایران (موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور) استفاده گردید (جدول 1).

جدول 1- اطلاعات جدایه‌های استفاده شده در این مطالعه

Accession No.	Taxonomic Name	Substrate	Origin
IRAN 782 C (CBS 113634)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Iran, Mashad
IRAN 783 C (CBS 113633)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Iran, Mashad
IRAN 798 C	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Iran, Mashad
IRAN 802 C (CBS 116386)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Iran, Urmia
IRAN 803 C (CBS 116387)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Heterodera schachtii</i>	Iran, Urmia
IRAN 1124 C (CBS 101296)	<i>Verticillium epiphytum</i>	pustule of rust fungus	UK
IRAN 1125 C (CBS 384.81)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Helminthosporium triumfettae</i>	Thailand
IRAN 1126 C (CBS 154.61)	<i>Verticillium epiphytum</i>	uredinium of rust	India, Khandala
IRAN 1132 C (CBS 101268)	<i>Verticillium epiphytum</i>	Uredinales	India
IRAN 1136 C (CBS 650.85)	<i>Verticillium epiphytum</i> strain	of <i>Cephalosporium pimprinum</i>	India
IRAN 1137 C (CBS 101285)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Phacopsora pachyrhizi</i>	Thailand
IRAN 1141 C (CBS 11897)	<i>Verticillium epiphytum</i>	<i>Hemileia vastatrix</i> (coffee rust)	Uganda

IRAN: مجموعه قارچ‌های زنده ایران، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور.

CBS: مجموعه قارچ‌های زنده هلند، اوترخت.

استخراج DNA کل

ابتدا جدایه‌ها جهت تولید ریسه‌هایی که DNA از آنها استخراج گردد در محیط کشت مایع گلوکز-

مخمر کشت گردیدند (Zare et al., 1999). پس از گذشت یک هفته اقدام به استخراج DNA

کل قارچ گردید. بدین منظور از روش Raeder and Broda (1985) استفاده گردید.

الکتروفورز DNA کل

5 میکرولیتر از محصول استخراج شده را با یک میکرولیتر بافر بارگذاری (شرکت سینازن) مخلوط

نموده روی ژل آگاروز 1٪ حاوی 0/001٪ اتیدیوم بروماید و TBE 1X (0/089 M Tris-Base,)

0/43 M Tris-Borate, 0/01 یا pH 8/3, 0/089 M Boric Acid, 0/002 M EDTA

(M EDTA) برده شد. این ژل با اختلاف پتانسیل 80 ولت الکتروفورز گردید. ژل پس از پایان الکتروفورز با دستگاه (BioRad) GelDoc (UV مشاهده و عکسهای لازم تهیه گردید).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

این واکنش جهت تکثیر و مقایسه بخش‌هایی از ژنوم قارچ *V. epiphytium* و با روش معمول (Mullis and Faloona, 1987) در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) انجام گرفت.

ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacer)

با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.*, 1990) نواحی ITS و ژن مرکزی 5.8S از DNA ریبوزومی جدایه‌های مختلف *V. epiphytium* در دستگاه ترموسایکلر (BioRad) تکثیر شد.

ژن Translation Elongation Factor 1- α (TEF)

جهت تکثیر این بخش از ژنوم قارچ ابتدا انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با پرایمرهای EF1-728F و EF1-986R و با استفاده از برنامه توصیه شده (Carbone and Cohn, 1999) انجام گردید. با توجه به اینکه این آغازگرها قادر به تکثیر این ژن در قارچ *V. epiphytium* نبودند در مرحله بعد ابتدا از آغازگرهای EF-1 و EF-2 (Gonzales *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 1998) استفاده شد. در این مرحله در هر جدایه چندین باند تکثیر شد که جهت تکثیر فقط یک قطعه از این ژنوم از آغازگرهای داخلی EF-3 و EF-22T (O'Donnell *et al.*, 1998) در محصول PCR مرحله قبل (nested PCR) استفاده گردید.

ژن β -tubulin

به منظور تکثیر بخشی از ژن β -tubulin ابتدا از پرایمرهای Bt1a و Bt1b (Glass and Donaldson, 1995) استفاده گردید که با توجه به عدم تکثیر در تعدادی از نمونه‌ها در مرحله بعد از پرایمرهای T1 و T2 (O'Donnell and Cigelnik, 1997) استفاده گردید.

ژن کالمودولین (Calmodulin)

جهت تکثیر بخشی از ژن کالمودولین از آغازگرهای CAL-228F و CAL-737R (Carbone and Cohn, 1999) استفاده گردید.

ناحیه IGS (Intergenic Spacer)

جهت تکثیر این ناحیه Gradient PCR از آغازگرهای PTR1a و PTR1b (Carbone and Cohn, 1999) و IGS-12a و NS1R (Cohn, 1999) انجام گرفت.

ژن Actin

تکثیر بخشی از این ژن به کمک آغازگرهای ACT-512F و ACT-783R (Carbone and Cohn, 1999) انجام گرفت.

ناحیه زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی (Large subunit nuclear ribosomal)

(DNA= LSU)

کوشش جهت تکثیر ناحیه LSU توسط پرایمرهای LR0R و LR3 (Vilgalys and Sun, 1994) صورت پذیرفت.

موفقیت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با انجام الکتروفورز در ژل آگاروز 1/2٪ رنگ شده با اتیدیوم بروماید و در کنار نشانگر DNA با وزن مولکولی پایین (Fermentas No. SM1143) و در نهایت مشاهده به وسیله دستگاه (BioRad) GelDoc تایید گردید. محصول PCR تا زمان خالص سازی در فریزر -40°C نگهداری شد.

خالص سازی محصول PCR

پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، جهت جدا کردن محصول PCR از سایر اجزا واکنش مثل آغازگرها، آنزیم‌ها، نمک‌ها و dNTPs از کیت خالص سازی Corebio (Corebio Ltd, South Korea) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

تعیین توالی

نمونه‌های جمع آوری شده از مرحله قبل ابتدا در دستگاه DNA concentrator (Eppendorf) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده در دمای اتاق و خلاء همراه با چرخش خشک شده و همراه با آغازگرهای اختصاصی جهت تعیین توالی ارسال گردید. مشخص شدن توالی ژنوم یا بخشهای ژنومی به کمک آغازگرهای استفاده شده جهت PCR و توسط دستگاه کاپیلاری تعیین توالی (ABI Prism 3700 DNA Analyzer, PE Applied Biosystems Hitachi) در آزمایشگاه پروفیسور اسپاتافورا (دانشگاه ایالتی اورگون، آمریکا) انجام گردید.

همردیف کردن توالی‌ها و مطالعات فیلوژنتیکی

جهت تصحیح و همردیف کردن اولیه توالی‌ها از گزینه Pairwise Alignment برنامه GeneDoc (ver. 1.6.0.2) (Nicholas and Nicholas, 1997) استفاده شد. توالی‌ها ابتدا به صورت اتوماتیک و سپس به صورت دستی تنظیم و اصلاح گردیدند. سپس فایل ماتریکس توالی‌ها با فرمت Clustal جهت ترسیم شجره فیلوژنتیکی در نرم افزار CLUTAL (ver. 1.81) (Thompson *et al.*, 1997) اکسپورت (export) شدند. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با روش محاسبه فاصله (distance) انجام شد. شجره با روش NJ (Neighbor-Joining) با انتخاب گزینه Kimura-II و 1000 بار تکرار bootstrap انجام و شجره ترسیم شد. درخت‌های فیلوژنتیکی توسط نرم افزار Tree View (ver 1.6.6) (Page 1996) مشاهده و نهایتاً درخت‌های فیلوژنی در نرم افزار Power Point ویرایش شدند.

آزمونهای ریخت شناسی

کلیه جدایه‌های *V. epiphytum* روی محیط سیب زمینی- هویج- آگار (PCA؛ حاوی عصاره 20 گرم سیب‌زمینی و هویج و 17 گرم آگار که در یک لیتر آب مقطر حل شده است) و سیب زمینی- دکسروز- آگار (PDA) کشت شده (Gams *et al.*, 2007) و پس از 15 روز هر جدایه رشد کرده

روی PDA جداگانه بررسی، اندازه‌گیری‌های لازم از کنیدی‌ها (30 عدد)، فیالیدها (10 عدد) و کل‌امیدوسپورها (تمام موارد) انجام شده و از بخش‌های مختلف هر جدایه عکس‌های لازم توسط میکروسکوپ زایس (Zeiss) مجهز به دوربین دیجیتال (Canon-G5) تهیه شد. اندازه‌گیری عرض کنیدی و فیالید در پهن‌ترین قسمت آنها انجام گرفت.

تست دما

جهت بررسی میزان رشد جدایه‌ها در دماهای مختلف و ارتباط آن با ویژگی‌های مولکولی، جدایه‌ها در محیط PDA کشت شده و در دماهای 12، 15، 18، 21، 24، 28، 30 و 33 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ده روز میزان رشد قطری هر جدایه اندازه‌گیری و ثبت گردید (زارع، اطلاعات منتشر نشده).

نتایج:

پس از انجام آزمون زنجیره‌ای پلی‌مراس با آغازگرهای اختصاصی، خالص سازی محصول این واکنش و تعیین توالی جدایه‌های مختلف *V. epiphytium*، نتایج در پایگاه داده‌های نوکلئوتیدی (بانک ژن) با استفاده از موتور جستجوی BLASTN (ver. 2.2.17) (Altschul et al., 1997) بررسی و صحت بخش تکثیر شده مورد تایید قرار گرفت. توالی هم‌ردیف شده ژنها یا بخش‌های ژنومی تکثیر شده به شرح ذیل می‌باشد:

ناحیه ITS (Internal Transcribed Spacer)

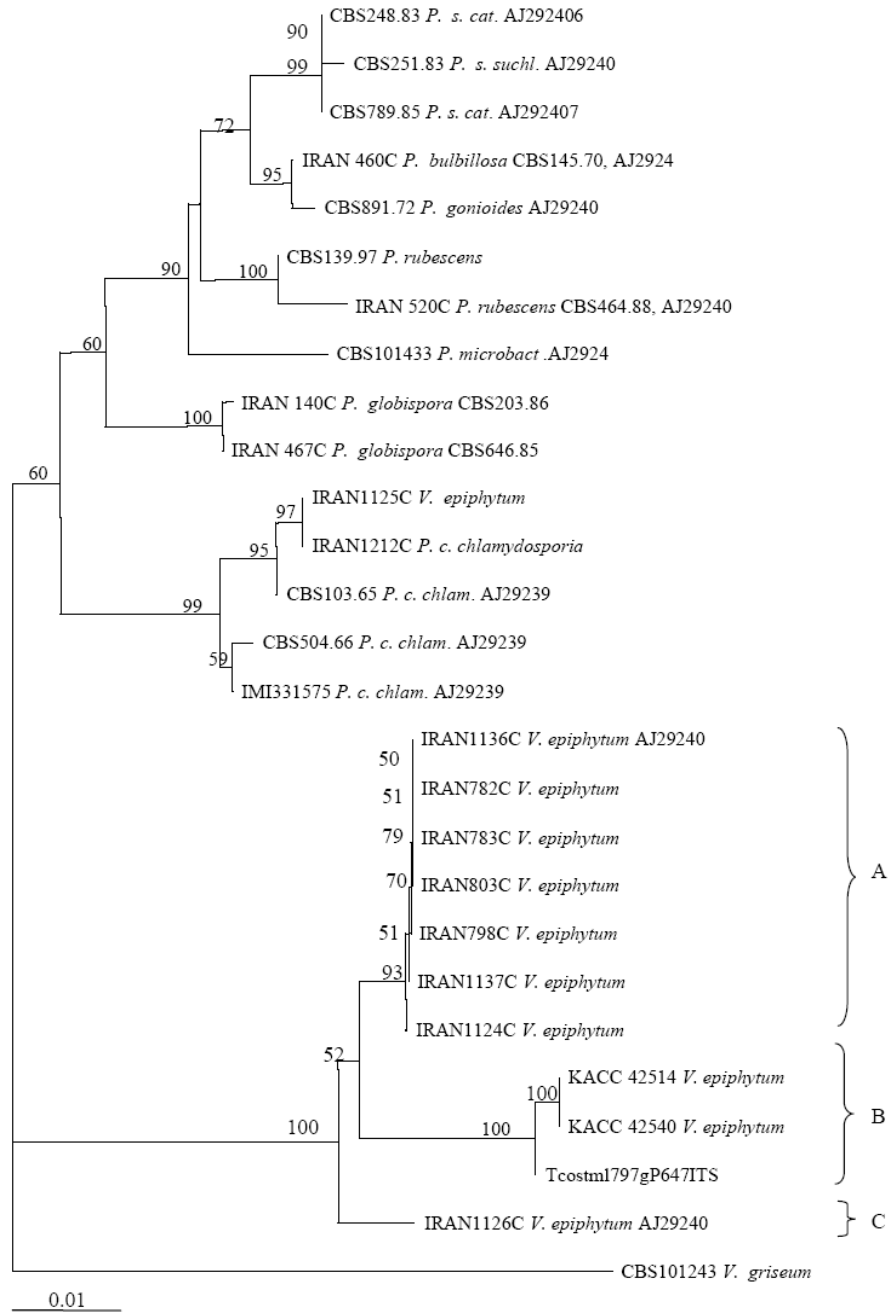
هم‌ردیفی اسیدهای نوکلئیک جدایه‌های مختلف قارچ *V. epiphytium* با گونه‌های مختلف جنس *Pochonia* که قبلاً شباهت آنها تایید شده است (Zare and Gams, 2004) و گونه *Verticillium griseum* بعنوان گروه خارجی (Outgroup) انجام شده و درخت فیلوژنی ریشه دار آن (rooted) در شکل 1 نشان داده شده است. این درخت بر اساس ناحیه هم‌ردیف (align) شده 416 تا 615 جفت بازی قارچ *V. epiphytium* رسم شده است. همانطور که در شکل مشخص است جدایه‌های مختلف قارچ *V. epiphytium* با 100٪ حمایت bootstrap در سه

گروه متفاوت قرار می‌گیرند. یکی از گروه‌ها به جدایه C 1126 IRAN تعلق دارد. گروه دیگر شامل دو جدایه قارچی از مجموعه قارچ شناسی کشور کره جنوبی (KACC 42514, KACC 42540) و یک جدایه از قارچ *Tuberculina costaricana* (ml797gP647) شده و سایر جدایه‌ها (IRAN 1136C, IRAN 782C, IRAN 783C, IRAN 803C, IRAN 798C, IRAN 1137C, IRAN 1124C) در گروه آخر قرار می‌گیرند.

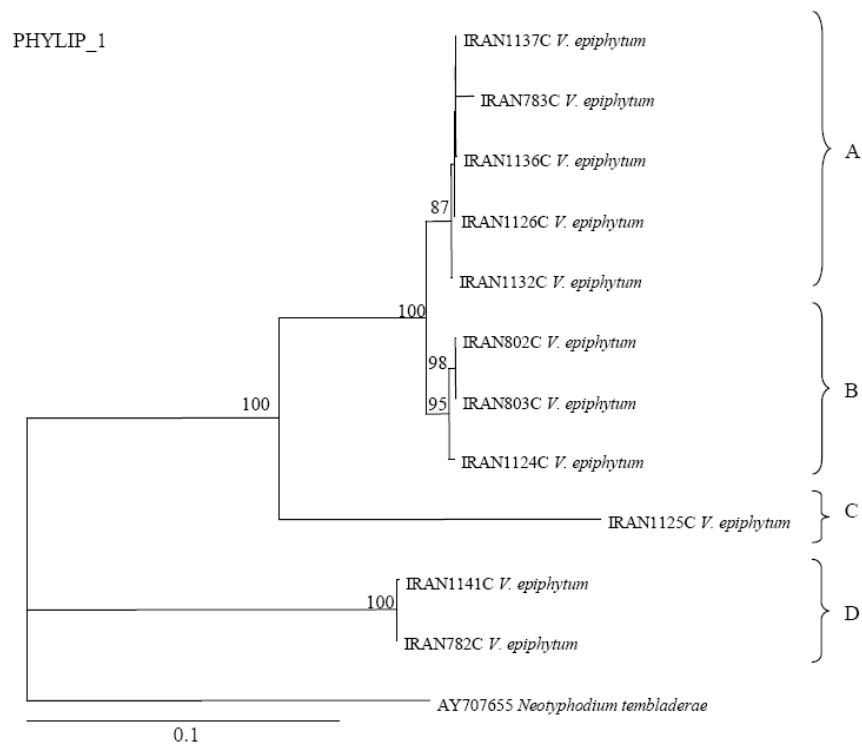
ژن Translation Elongation Factor 1- α (TEF)

توالی‌های بدست آمده این ژن در جدایه‌های مختلف قارچ *V.epiphytum* با گونه *Neotyphodium tembladerae* (strain Ms803) با کد دسترسی AY707654 از خانواده Clavicipitaceae بعنوان گروه خارجی هم‌ردیف شده و پس از تعیین گروه خارجی در نرم افزار Tree View، درخت فیلوژنی ریشه‌دار شده (rooted) آن رسم گردید (شکل 2). این درخت بر اساس ناحیه هم‌ردیف (align) شده 424-554 جفت بازی قارچ *V. epiphytum* رسم شده است و بهترین وضوح (رزولوشن) را برای تفکیک جدایه‌های مختلف این قارچ از یکدیگر دارد. پایین‌ترین clade با 100٪ حمایت bootstrap از دو جدایه IRAN 1141C و IRAN 782C تشکیل شده است. جدایه IRAN 1125C نیز با 100٪ حمایت bootstrap از بقیه جدا شده و سایر جدایه‌ها نیز به ترتیب با 95٪ (IRAN 1124C, IRAN 802C, IRAN 803C) و 87٪ (IRAN 1137C, IRAN 783C, IRAN 1136C, IRAN 1126C, IRAN 1132C) حمایت bootstrap در گروه‌های مشابه قرار می‌گیرند.

PHYLIP_1



شکل 1- درخت فیلوژنتیکی Neighbor-Joining بر اساس توالی ناحیه ITS1+5.8S+ITS2 (416 تا 615 جفت باز). اعداد بالای هر شاخه نشان دهنده درصد تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) می باشد.



شکل 2- درخت فیلوژنتیکی Neighbor-Joining بر اساس توالی ژن TEF (424-554 جفت باز). اعداد بالای هر شاخه نشان دهنده درصد تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) می باشد.

ژن β -tubulin

توالی این بخش از ژنوم نیز با گونه *Epichloë baconii* با کد دسترسی AJ490938 از خانواده Clavicipitaceae بعنوان گروه خارجی همردیف شده و درخت فیلوژنی ریشه دار آن بر اساس میزان شباهت توالی های 613-667 جفت بازی جدایه ها در شکل 3 نشان داده شده است. جدایه ها با 100٪ حمایت bootstrap به دو گروه تقسیم می شوند. یکی از گروه ها حاوی دو جدایه IRAN 1125C و IRAN 1141C می باشد. گروه دوم با 60٪ حمایت bootstrap به دو گروه مجزا تفکیک می شود که یکی از آنها شامل IRAN 802C و IRAN 803 C شده و دیگری از

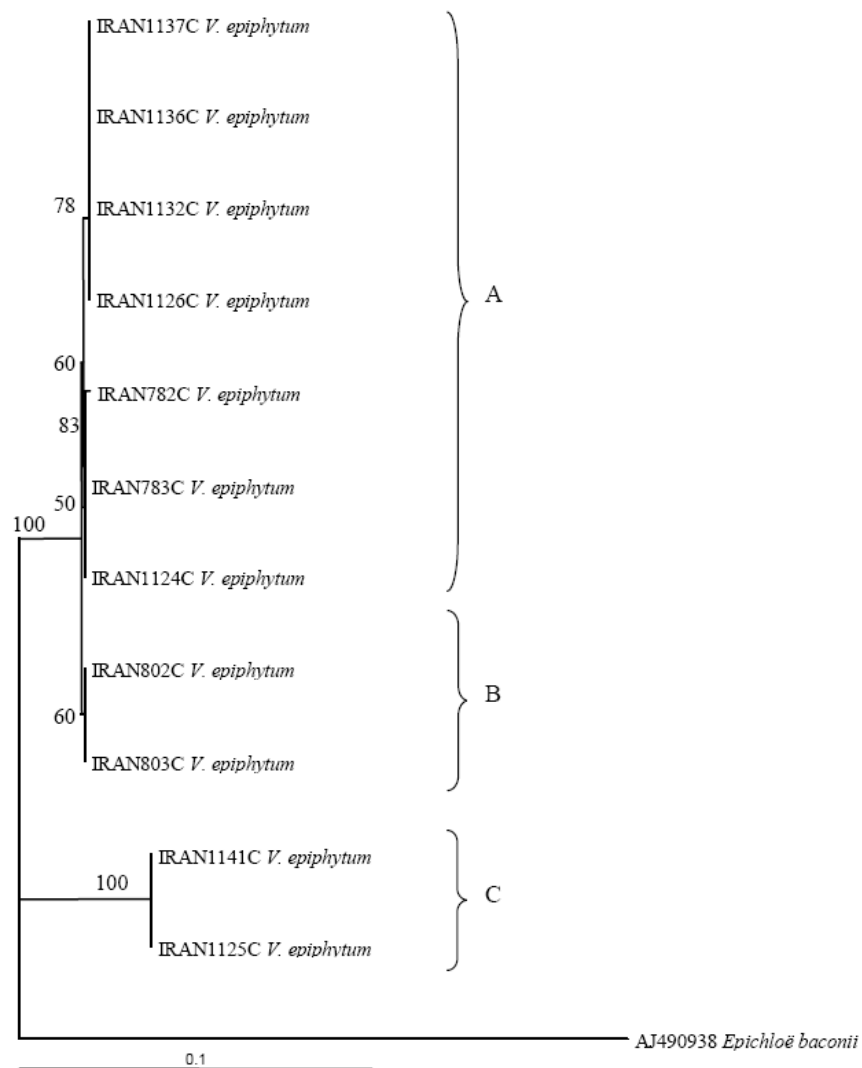
IRAN 1137C, IRAN 1136C, IRAN 1132C, IRAN 1126C, IRAN 782C,
IRAN 783C, IRAN 1124C تشکیل شده است.

ژن Calmodulin

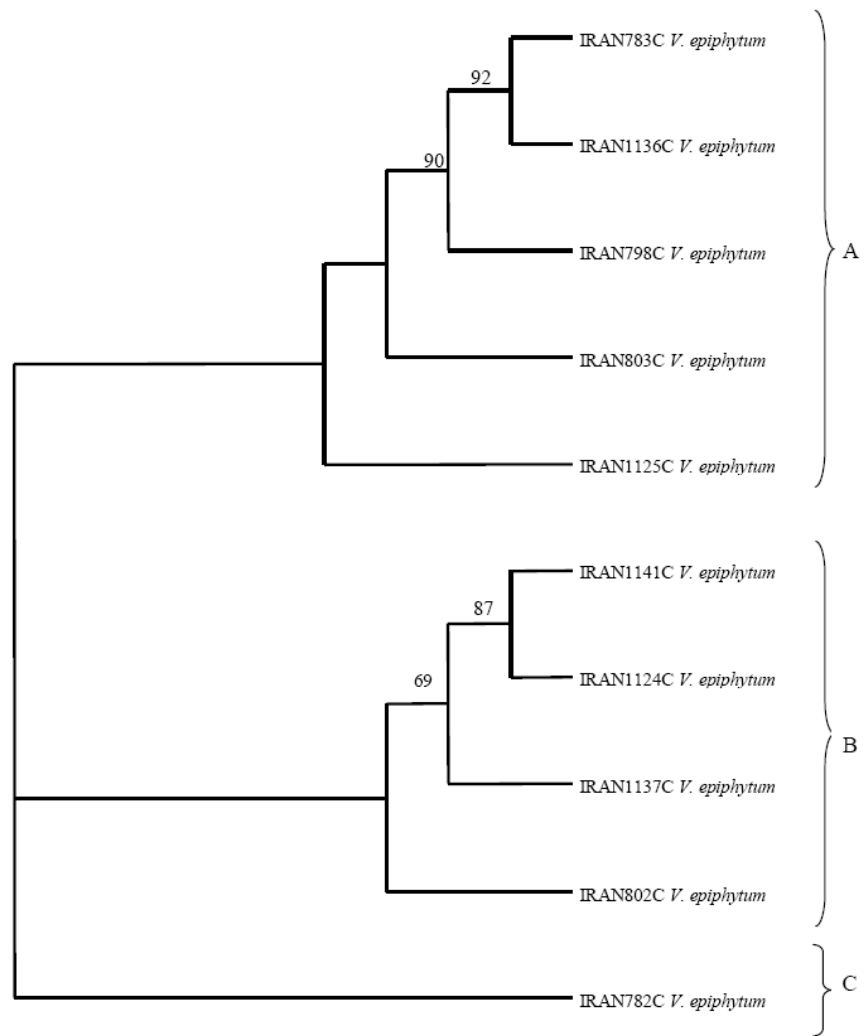
پس از تعیین توالی این ژن با آغازگرهای اختصاصی، توالی‌های بدست آمده توسط موتور جستجوی BLASTN در بانک ژن (پایگاه داده‌های نوکلئوتیدی) جستجو گردید که با توالی‌های ژن کالمودولین موجود در بانک ژن همخوانی نداشت. به هر حال این توالی‌های 158-187 جفت بازی به صورت unrooted و بدون مقیاس به روش rectangular cladogram با یکدیگر مقایسه و گروه‌های مشابه مشخص شدند (شکل 4). با توجه به حمایت پایین درصد تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) از گروه‌های تفکیک شده‌ی درخت فیلوژنتیکی به نظر می‌رسد که درخت رسم شده ارزش چندانی در گروه بندی نمونه‌ها نداشته باشد. به هر حال بر اساس این درخت، جدایه‌ها در سه گروه قرار می‌گیرند. گروه اول شامل IRAN 782C، گروه دوم شامل IRAN 802C, IRAN 1137C, IRAN 1124C, IRAN 1141C و گروه سوم شامل IRAN 1125C, IRAN 803C, IRAN 798C, IRAN 1136C, IRAN 783C می‌باشد.

مقایسه توالی ترکیبی ژن‌ها یا نواحی ژنومی تکثیر شده

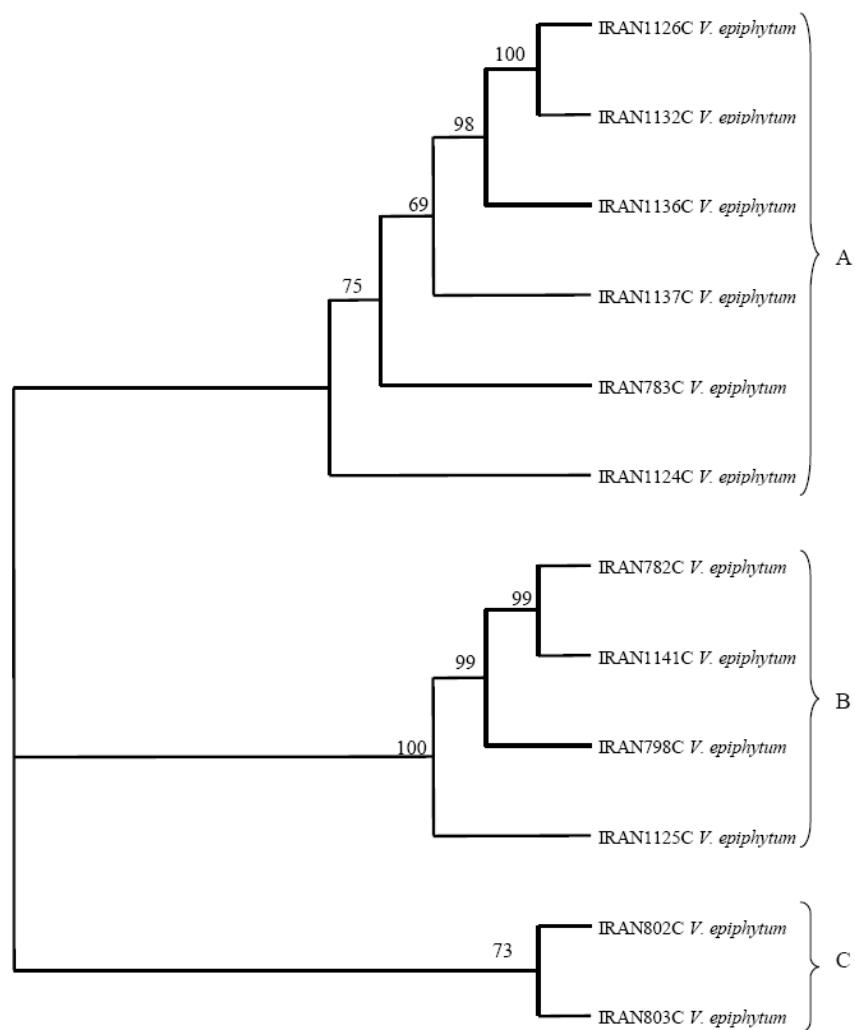
بدین منظور ابتدا توالی‌های بدست آمده‌ی هر جدایه در هر مرحله با ترتیب مشخص (ابتدا کالمودولین، سپس TEF، توبولین و نهایتاً ناحیه ITS) به هم متصل شده و مجموعه این توالی‌ها با یکدیگر مقایسه و جدایه‌های مشابه به صورت unrooted به روش rectangular cladogram مشخص شدند (شکل 5). مطابق شکل جدایه‌ها در سه گروه قرار می‌گیرند که به ترتیب دارای 73٪، 100٪ و 39٪ حمایت bootstrap هستند. در گروه سوم به جز جدایه IRAN 1124C، محل قرار گرفتن سایر جدایه‌ها از حمایت bootstrap نسبتاً خوبی (به ترتیب 75٪، 69٪، 98٪ و 100٪) برخوردار است.



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی Neighbor-Joining بر اساس توالی ژن β -tubulin (613-667 جفت باز). اعداد بالای هر شاخه نشان دهنده درصد تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) می باشد.



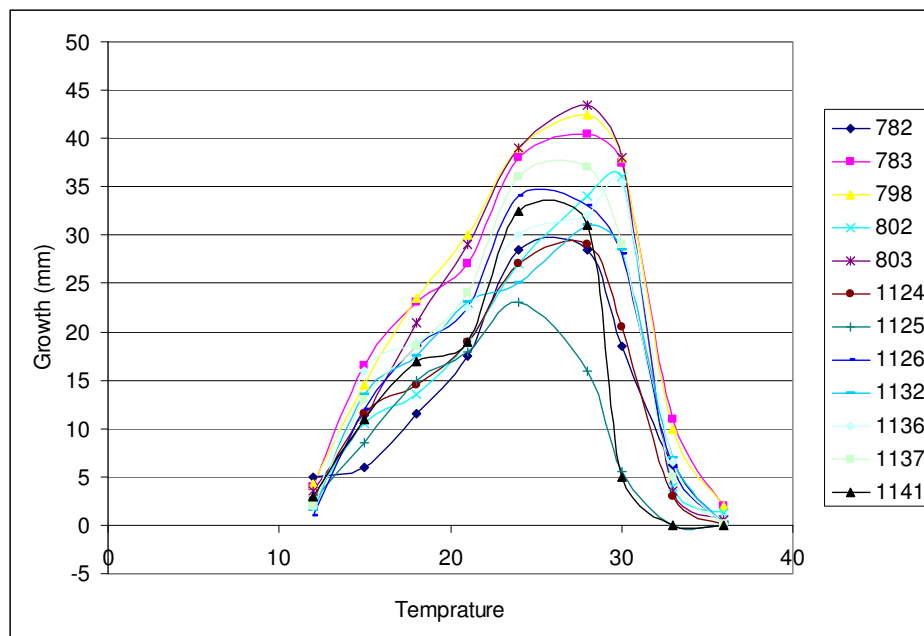
شکل 4- درخت فیلوژنتیکی Neighbor-Joining بر اساس توالی ژن Calmodulin (187)-
 158 جفت باز) به روش rectangular cladogram. اعداد بالای هر شاخه نشان دهنده درصد
 تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) می باشد.



شکل 5- درخت فیلوژنتیکی Neighbor-Joining بر اساس ترکیبی از توالی‌های Calmodulin, TEF, β -tubulin و ITS به روش rectangular cladogram. اعداد بالای هر شاخه نشان دهنده درصد تکرارهای تایید شده (مقدار حمایت bootstrap) می‌باشد.

تست دما

بر اساس اندازه‌گیری میزان رشد قارچ پس از ده روز در دماهای مختلف، مقدار رشد قطری جدایه‌های مختلف به میلی‌متر در شکل 6 نشان داده شد.



شکل 6- مقدار رشد جدایه‌های مختلف قارچ *V. epiphytium* (به میلی متر) پس از ده روز در دماهای مختلف.

آزمونهای ریخت شناسی قارچ *V. epiphytium*

پس از 15 روز رشد جدایه‌ها روی محیط PDA، اندازه‌گیری کنیدی‌ها (30 عدد)، فیالیدها (10 عدد) و کلامیدوسپورها (تمام موارد) انجام شده و اندازه‌گیری‌ها همراه با سایر ویژگی‌های شاخص هر جدایه ثبت گردید. همه کنیدی‌ها تک سلولی بودند و کلامیدوسپور در جدایه‌های IRAN 782C, IRAN 802C, IRAN 803C, IRAN 1124C, IRAN 1125C جدایه‌های IRAN 783C, IRAN 798C, IRAN 1141C تولید کریستال نموده و ریشه جدایه‌های IRAN 1137C و IRAN 1125C از بقیه جدایه‌ها ضخیم‌تر بود.

بحث:

داده‌های مولکولی در سالهای اخیر در تبدیل هیفومیستهای شبه ورتیسلیوم که از نظر فیلوژنتیکی گروهی ناجور بودند، به گروه‌های طبیعی کمک شایانی نموده است (Gams and Zare, 2001; Sung *et al.*, 2001; Zare and Gams, 2001, 2004; Zare *et al.*, 2005; Fahleson *et al.*, 2003; Pantou *et al.*, 2005). جدایه‌های مختلف *epiphytum* پس از مقایسه با توالی سایر گونه‌ها از جمله *Pochonia* که قبلاً شباهت آنها مشخص شده بود بر اساس توالی‌های ناحیه ITS با 100٪ حمایت bootstrap در یک گروه قرار می‌گیرند و سپس در درون این clade به سه گروه تقسیم می‌شوند. یکی از گروه‌ها به جدایه IRAN 1126 C تعلق دارد. گروه دیگر شامل دو جدایه قارچی از مجموعه قارچ شناسی کشور کره جنوبی (KACC 42514, KACC 42540) و یک جدایه از قارچ *Tuberculina costaricana* (ml797gP647) شده و سایر جدایه‌ها (IRAN 1136C, IRAN 782C, IRAN 1124C, IRAN 783C, IRAN 803C, IRAN 798C, IRAN 1137C) در گروه آخر قرار می‌گیرند. بر اساس مقایسه توالی β -tubulin جدایه‌ها با 100٪ حمایت bootstrap به دو گروه تقسیم می‌شوند. یکی از گروه‌ها حاوی دو جدایه IRAN 1125C و IRAN 1141C می‌باشد. گروه دوم با 60٪ حمایت bootstrap به دو گروه مجزا تفکیک می‌شود که یکی از آنها شامل IRAN 802C و IRAN 803 C شده و دیگری از IRAN 1137C, IRAN 1136C, IRAN 1132C, IRAN 1126C, IRAN 782C, IRAN 783C, IRAN 1124C تشکیل شده است. داده‌های این بخش تطابق بیشتری با داده‌های مورفولوژی دارد. جدایه‌های IRAN 1125C و IRAN 1141C از نظر میزان رشد قطری پرگنه در دماهای مختلف و ظاهر پرگنه با یکدیگر شبیه و با سایر جدایه‌ها متفاوت هستند. شجره فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه توالی ژن TEF بالاترین حمایت bootstrap را برای تفکیک جدایه‌های مختلف این قارچ از یکدیگر دارد. پایین‌ترین clade با 100٪ حمایت bootstrap از دو جدایه IRAN 1141C و IRAN 782C تشکیل شده است. جدایه IRAN 1125C نیز با 100٪ حمایت

bootstrap از بقیه جدا شده و سایر جدایه‌ها نیز به ترتیب با 95٪ (IRAN 1124C, IRAN 1137C, IRAN 783C, IRAN 1136C,) و 87٪ (IRAN 802C, IRAN 803C) حمایت bootstrap در گروه‌های مشابه قرار می‌گیرند. مقایسه توالی ترکیبی ژن‌ها یا نواحی ژنومی تکثیر شده آن‌ها را در سه گروه قرار می‌دهد که به ترتیب دارای 73٪، 100٪ و 39٪ حمایت bootstrap هستند. در گروه سوم به جز جدایه IRAN 1124C، محل قرار گرفتن سایر جدایه‌ها از حمایت bootstrap نسبتاً خوبی (به ترتیب 75٪، 69٪، 98٪ و 100٪) برخوردار است. جدایه‌های IRAN 802C و IRAN 803C با 100٪ حمایت در یک گروه قرار می‌گیرند. جدایه‌های اخیر هر دو از ارومیه جدا شده‌اند. جدایه‌های IRAN 1125C و IRAN 1141C نیز که از نظر ظاهری و توقف رشد در دمایی کمتر از سایر جدایه‌ها شبیه یکدیگرند در یک گروه قرار می‌گیرند. جدایه‌هایی که از مشهد جدا شده‌اند در گروه‌های متفاوتی قرار می‌گیرند. نکته جالب دیگر قرار گرفتن جدایه‌های IRAN 1132C، IRAN 1126C و IRAN 1136C که از کشور هند جدا شده‌اند، در یک گروه در شجره‌های فیلوژنتیک β -tubulin، ژن TEF و توالی ترکیبی ژن‌ها یا نواحی ژنومی تکثیر شده است. بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی جدایه‌های مختلف گونه *V. epiphytum* را می‌توان در سه گروه که احتمالاً سه گونه مجزا هستند قرار داد که درخت فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس ترکیبی از توالی‌های Calmodulin، TEF، β -tubulin و ITS نشان دهنده این سه گونه هستند. مسلماً جهت اظهار نظر قطعی در خصوص گروه‌بندی این گونه مطالعه مجدد و دقیق مورفولوژی و تحقیقات بیشتر مولکولی نیاز است.

- Altschul, S.F., Thomas, L.M., Alejandro, A.S., Jinghui, Z., Zheng, Z., Webb, M. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Carbone, I. and Kohn, L. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91: 553-556.
- Fahleson, J., Langercrantz, U., HU, Q, Steventon, L.A. and Dixelius, C. 2003. Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109: 361-371.
- Gams, W. 1971. *Chealosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Gams, W. and Zare, R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classificaton. *Nove Hedwigia* 72: 329-337.
- Gams, W., Verkley, G.J. and Crous, P.W. (eds). 2007. *CBS Course of Mycology*, 5th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Glass, N.L and Donaldsson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genus from filamentous ascomycetes. *Applied Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- Gonzalez, F.J., Walls, S. and Mancilla, M. 2005. Detection by PCR-RFLP of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* causal agent of fusariosis in strawberry. *Boletin Micologico* 20: 63-72.

- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc>. Distributed by the authors.
- O'Donnell, K. and Cigelnik, E. 1997. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 103-116.
- O'Donnell, K., Cigelnik, E. and Nirenberg, H.I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90: 465-493.
- Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pantou, M.M., Strunnikova, O.K., Shakhnazarova, V.Y.U., Vishnevskaya, N.A., Papalouka, V.G. and Typas, M.A. 2005. Molecular and immunochemical phylogeny of *Verticillium* species. *Mycological Research* 109: 889-902.
- Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-ard, J.J., Shresta, B. and Spatafora, J.W. 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 1-63.
- Sung, G.H., Spatafora, J.W., Zare, R. Hodge, K.T. and Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prosrata*. II. Phylogenetic analyses of SSU and LSU nuclear rDNA sequences from anamorphs and teleomorphs of the Clavicipitaceae. *Nova Hedwigia* 72: 311-328.

- Thompson, J. D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Vilgalys, R. and Sun, B.L. 1994. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences. *The Proceedings of the National Academy of Sciences Online, USA* 91: 4599-4603.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes from phylogenetics. pp. 315-322. *In: PCR protocols* (Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.S. and White, T.J., eds). Academic Press: London, UK.
- Zare, R. and Fatemy, S. 2004. First report of *Verticillium epiphyum* from Iran with notes on *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* in Iran. *Rostaniha* 5: 50-51.
- Zare, R. and Gams, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. VI. The genus *Haptocillium*. *Nova Hedvigia* 73: 271-292.
- Zare, R. and Gams, W. 2004. A monograph of *Verticillium* section *Prostrata*. *Rostaniha (Botanical Journal of Iran)* 3: 188pp.
- Zare, R., Gams, W. and Evans, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*, V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedvigia* 73: 51-86.
- Zare, R., Kouvelis, V.N., Typas, M.A. and Bridge, P.D. 1999. Presence of a 20 bp insertion/deletion in the ITS1 region of *Verticillium lecanii*. *Letters in Applied Microbiology* 28: 258-262.