

## توصیف ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ بیمارگر حشرات *Cordyceps farinosa* و تجزیه و تحلیل تبارشناسی جنس بر اساس ترادف نواحی ITS-rDNA و $\beta$ -tubulin

ژیلا علی‌زاده، ناصر عیوضیان کاری\*، داود محمدی و علی مهرور

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: eivazian@azaruniv.ac.ir

### چکیده

طی نمونه‌برداری از خاک، جدایه‌ای از قارچ‌های بیمارگر حشرات با استفاده از تله‌گذاری با لارو سن آخر *Galleria mellonella* جداسازی و با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی مبتنی بر ترادف‌های ناحیه ITS-rDNA و  $\beta$ -tubulin طبق روش‌های بیشینه پارسیمونی (Maximum Parsimony) شناسایی شد. در کنار بررسی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی، نتایج تجزیه و تحلیل تبارشناسی مبتنی بر هر دو ناحیه ژنومی درستی شناسایی گونه، به نام *Cordyceps farinosa* را تایید کرد. در جدایه مورد بررسی، کنیدیوم‌ها با میانگین طولی  $3/83$  و عرض  $1/98$  میکرومتر و بیضوی و کنیدی‌زها با میانگین طولی  $4/98$  و عرض  $2/21$  با گلوبوز عریض در بخش قاعده‌ای می‌باشند. طول قطعه تکثیر شده طی PCR برای ناحیه ITS،  $615$  و برای ناحیه ژنی بتاتوبولین  $355$  جفت باز بود. در تمامی درختان تبارشناسی مبتنی بر هر دو ناحیه ژنی، *C. farinosa* KJ3 با جدایه *C. farinosa* CBS 541.81 در یک گروه تک‌نمایی قرار گرفتند. در درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ITS-rDNA، گروه متشکل از *C. albocitrina* و *C. coccidioperitheciata* و در درخت مبتنی بر ترادف ژنی بتاتوبولین، *C. confrogasa* به عنوان گروه‌های خواهری *C. farinosa* ظاهر شدند. با هدف بررسی کارایی نواحی ژنومی مورد استفاده در مطالعات تبارشناسی جنس به صورت تنها و در ترکیب با هم، درختان تبارشناسی با گونه‌های مشابه ترسیم و از نظر شاخص ثبات، شاخص بازدارندگی و توپولوژی با هم مقایسه شدند. توپولوژی درخت تبارشناسی حاصل از تلفیق هر دو مکان ژنی پلیتومی کمتر و وضوح بیشتری در بیان روابط گونه‌ها در مقایسه با درخت مبتنی بر ترادف ITS-rDNA داشت. در مجموع نتایج نشان داد که ترادف ناحیه ژنی بتاتوبولین در مقایسه با ناحیه ITS-rDNA از کارایی بیشتری در مطالعات تبارشناسی در جنس *Cordyceps* برخوردار می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بتا-توبولین، درخت تبارشناسی، ریخت‌شناسی، قارچ بیمارگر حشرات، ITS-rDNA

## Morphological and molecular characterization of an entomopathogenic fungus, *Cordyceps farinosa* and phylogenetic analysis of the genus based on the ITS-rDNA and $\beta$ -tubulin sequences

Zhila Alizadeh, Naser Eivazian Kary\*, Davoud Mohammadi & Ali Mehrvar

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

\* Corresponding author, E-mail: eivazian@azaruniv.ac.ir

### Abstract

An isolate of entomopathogenic fungus was isolated from the soil samples by using the Galleria bait method. Species identification was carried out using morphology and phylogenetic analysis of ITS-rDNA region and  $\beta$ -tubulin gene sequences by Maximum parsimony (MP) method. Based on the both morphological and molecular characterization, the isolate KJ3 was identified as *Cordyceps farinosa*. The isolates showed an ellipsoidal conidial shape with overall dimensions of  $3.83 \times 1.98 \mu\text{m}$  (length  $\times$  width). The phialide of the isolate was characterized by a wide globose basal portion and overall dimensions of  $4.98 \times 2.21 \mu\text{m}$ . The PCR-amplified ITS and  $\beta$ -tubulin regions were 615 and 355 bp,

دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۱، پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

دبیر تخصصی: رضا طلایی حسنلوئی

respectively. In all constructed phylogenetic trees, *C. farinosa* isolate KJ3 grouped together with *C. farinosa* CBS 541.81 as a monophyletic group. Based on the ITS-rDNA sequence, in reconstructed phylogenetic tree, a group including *C. albocitrina* and *C. coccidioperitheciata* appeared as sister group of *C. farinosa*. *Cordyceps confrogasa* was the genealogically closest species to *I. farinosa* based on the  $\beta$ -Tubulin sequence. With the aim of comparing the efficiencies of ITS-rDNA and  $\beta$ -Tubulin sequences for *Cordyceps* spp. genealogic studies, MP phylogenetic trees with the similar sets of species were reconstructed based on the both genomic regions in combination and alone and then compared in terms of consistency index, retention index and topology. The results showed that phylogenetic analysis based on the  $\beta$ -Tubulin sequence is more efficient way for genealogical studies in *Cordyceps* spp..

**Key words:**  $\beta$ -Tubulin, Entomopathogenic fungi, ITS-rDNA, Morphology, Phylogenetic tree

Received: 22 August 2020, Accepted: 15 March 2021.

## مقدمه

قارچ‌های بیمارگر حشرات به دلیل کارایی بالا در مهار زیستی آفات، همواره مورد توجه متخصصین بوده و بررسی‌های گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف از جمله انتخاب نژادهای مناسب و کارآمد برای استفاده در برنامه‌های مدیریت تلفیقی آفات (IPM) صورت گرفته است (Meyling, 2008). در بحث مدیریت تلفیقی آفات، پیگیری عوامل کنترل زیستی جدید و شناسایی دقیق گونه‌ها و تنوع موجود، از اهمیت اساسی برخوردار می‌باشد. با توجه به توانایی قارچ‌های بیمارگر حشرات در نفوذ مستقیم به بدن حشره از طریق کوتیکول، این عوامل در برنامه‌های مدیریت آفات متعلق به گروه حشرات زننده-مکنده از اهمیت و کارایی بالایی برخوردار هستند (Shipp *et al.*, 2003).

جنس *Cordyceps* از قارچ‌های آسکومیست، پارازیت داخلی بندپایان و متعلق به خانواده Clavicipitaceae، راسته Hypocerales و رده Sordariomycetes می‌باشد (Eriksson *et al.*, 2004). جنس *Cordyceps* تا حدودی بزرگ و دارای بیش از ۶۰۰ گونه می‌باشد (Kendrick, 2003; Sung *et al.*, 2007). هر چند بیشتر گونه‌های این جنس، اساساً روی حشرات فعال می‌باشند، ولی گونه‌های محدودی نیز روی قارچ‌های جنس *Elaphomyces* یافت می‌شوند (Samson *et al.*, 1988).

قارچ *Cordyceps farinosa* (Holmsk) Fr. (syn: *Paecilomyces farinosus*) گونه‌ای خاک‌زی بوده و به‌طور معمول بیمارگر حشرات می‌باشد که تقریباً همه راسته‌های حشرات را آلوده می‌کند. این قارچ پراکنش وسیع داشته و به‌نظر می‌رسد در دماهای خنک‌تر مؤثرتر است. سویه‌های مختلف این گونه برای کنترل حشرات آفت متعدد به‌ویژه سفیدبالک‌ها استفاده می‌شوند (Zimmermann, 2008).

مشکلات استفاده از صفات ریخت‌شناختی در تشخیص گونه‌های قارچی، ضرورت استفاده از دیگر راه‌کارها در مطالعات رده‌بندی را اجتناب‌ناپذیر نموده است. رایج‌ترین ناحیه ژنومی مورد استفاده برای شناسایی و رده‌بندی قارچ‌ها، ناحیه rDNA است. به‌طور کلی ناحیه ITS نشان‌دهنده تنوع پیرامون سطح گونه بوده و به‌طور وسیعی برای شناسایی گونه‌ها و تجزیه تحلیل تبارشناختی درون جنس استفاده می‌شود. با این حال میزان انشعاب در توالی ITS ممکن است بین گروه‌های قارچی مختلف، متفاوت باشد. بعضی گونه‌ها درجه بالایی از تغییرپذیری درون-گونه‌ای در ناحیه ITS را نشان می‌دهند در حالی که در برخی جنس‌ها، گونه‌های بسیار وابسته تفاوت کمی را بروز می‌دهند (Rehner & Buckley, 2005; Rehner *et al.*, 2011).

در این مطالعه جدایه‌ای از جنس *Cordyceps*، که از نمونه‌های خاک متعلق به مناطق زراعی شهرستان جیرفت واقع در جنوب شرق کشور به‌دست آمده بود، با استفاده از صفات ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل تبارشناسی ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA و  $\beta$ -Tubulin شناسایی و سپس جایگاه تبارشناسی آن در ارتباط با دیگر جدایه‌های گونه بررسی شد. در گذشته این گونه در مطالعات مختلف و بر اساس صفات ریختی از ایران

شناسایی و گزارش شده بود، ولی بر اساس بررسی منابع صورت گرفته در این مطالعه در هیچ کدام از بررسی‌های مذکور از تجزیه و تحلیل تبارشناختی ترادف‌های ژنومی در شناسایی گونه استفاده نشده بود (Ghazavi et al., 2005; Parsi, 2019).

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری نمونه‌های خاک

نمونه‌های خاک به صورت تصادفی در قالب ده زیرنمونه توسط بیلچه و از عمق ۱۵ تا ۲۰ سانتی متری خاک از مناطق مختلف زراعی و غیر زراعی شهرستان جیرفت واقع در جنوب شرق کشور جمع‌آوری شد. زیرنمونه‌ها سپس به طور کامل و یکنواخت با یکدیگر مخلوط و به صورت یک نمونه واحد درآمدند. نمونه‌های خاک بعد از درج مشخصات محل نمونه‌برداری داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان تله‌گذاری در یخچال و در درجه حرارت ۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

### پرورش پروانه موم خوار بزرگ، *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)

کلنی پروانه موم خوار بزرگ در شرایط آزمایشگاهی در دمای  $28 \pm 2$  درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶:۸، L:D ساعت نگهداری شدند. برای پرورش لاروها از غذای مصنوعی متشکل از آرد گندم (۱۲۰۰ گرم)، پودر مخمر (۳۰۰ گرم)، عسل (۵۰۰ گرم)، موم (۱۲۰ گرم) و گلیسیرین (۵۰۰ میلی لیتر) استفاده شد.

### استخراج قارچ‌ها از خاک

استخراج قارچ بیمارگر از نمونه‌های خاک با استفاده از روش تله‌گذاری با حشرات انجام شد. این روش که اساساً برای استخراج نماتوئیدهای بیماریزای حشرات مورد استفاده قرار می‌گیرد، اولین بار توسط Zimmerman (1986) به عنوان یک روش کارآمد در استخراج طیف وسیعی از قارچ‌های بیمارگر حشرات از نمونه‌های خاک معرفی شد. نمونه‌های خاک در آزمایشگاه بعد از اختلاط کامل و خردکردن کلوخ‌ها و جداسازی بافت‌های گیاهی، توسط آب مقطر استریل (در صورت لزوم) مرطوب شدند. از هر نمونه خاک ۳ نمونه ۵۰ گرمی به داخل پتری‌های استریل حاوی ۱۵ عدد لارو سن آخر پروانه موم‌خوار بزرگ منتقل و در محیط تاریک و در دمای اتاق به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. لاروهای مرده (دارای رشد قارچی یا فاقد آن) پس از شستشوی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۱٪، سه نوبت با آب مقطر استریل شستشو و به پتری‌های حاوی کاغذ صافی استریل مرطوب منتقل و به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس با حصول اطمینان از عدم وجود آلودگی در نمونه‌های با رشد قارچی، نمونه‌های قارچ در محیط SDAY (Sabouraud Dextrose Agar + Yeast) کشت شدند. برای تک‌اسپور نمودن، سوسپانسیون کنیدیوم به صورت متوالی رقیق و سپس کشت شد. در نهایت یک واحد تشکیل دهنده کلنی (CFU = Colony Forming Unit) کشت و برای مطالعات بعدی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ذخیره شد.

### مطالعات ریخت‌شناختی

برای مطالعات ریخت‌شناختی از کشت ۱۰ روزه قارچ در محیط SDAY استفاده شد. حداقل ۳۰ کنیدیوم و کنیدی‌زا با استفاده از میکروسکوپ الپوس مدل BX53 اندازه‌گیری شدند. شناسایی جدایه بر اساس صفات ریختی و با استفاده از کلیدهای عمومی و اختصاصی انجام گرفت (Humber, 1997).

### استخراج DNA و انجام PCR و ترادف‌یابی

برای استخراج DNA از کشت‌های ۱۵ تا ۲۰ روزه استفاده شد. به این صورت که حدود ۵۰ میلی گرم از میسلیم قارچ با استفاده از تیغ جراحی به تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل و با استفاده از انجماد سریع در ازت

مایع و بلافاصله گذاخت در ۷۰ درجه سلسیوس دیواره سلولی تخریب و محتوای سلول‌ها در محیط آزاد شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (Tris-Hcl ۵۰ mM، EDTA ۵۰ mM، SDS ۳٪ و ۱٪ Mercaptoethanol-β) به هر تیوب اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد از دوره مذکور به تیوب‌ها ۳۵۰ میکرولیتر فنل اشباع و ۳۵۰ میکرولیتر مخلوط کلروفورم و ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱ به ۲۴) اضافه، ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شدند. سپس لایه رویی به تیوب‌های استریل منتقل و عملیات بالا با اضافه نمودن مخلوط کلروفورم و ایزوآمیل الکل و سانتیفریوژ به مدت ۱۰ دقیقه در همان دور با هدف حذف بقایای فنل تکرار گردید. پس از انتقال فاز رویی به تیوب‌های استریل، به منظور ترسیب DNA به هر نمونه سدیم استات ۳ مولار و ایزوپروپانول ۹۹٪ اضافه و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس، به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شدند. بعد از حذف فاز رویی نمونه‌ها با اتانول ۷۰٪ شست‌وشو و با قرارگیری در معرض هوا خشک شدند. در نهایت DNA استخراج شده در آب دیونیزه حل و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شد (Zhu et al., 1993).

برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA، از آغازگرهای ITS4-5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' و ITS5 5'- TAAAAGTCGTAACAAGG-3' GGAAG (White et al., 1990) و برای تکثیر بخشی از ژن β-Tubulin از آغازگرهای Bt2a-5' GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC3' و Bt2b5' ACCCTCAGTGAGTGACCCTTGGC3' (Glass & Donaldson, 1995) استفاده شد.

واکنش زنجیره پلیمرز برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام شد. اجزای واکنش شامل ۵ میکرولیتر از بافر PCR 10x (10 mM Tris/Hcl PH 8, 50 mM Kcl, 1.5-2.0 mM Mgcl2)، ۴ میکرولیتر مخلوط dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)، ۱۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای معکوس، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase و ۲۰-۵ نانوگرم از DNA ژنومی بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل: به ترتیب یک دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه در ۴۵ درجه سلسیوس و یک دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت یک چرخه انتهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود (Rehner & Buckley, 2005). برای تکثیر ناحیه ژنی β-tubulin از دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس استفاده شد. به منظور ترادف‌یابی فرآورده‌های PCR، ابتدا با استفاده از کیت خالص‌سازی (AccuPrep PCR Purification Kit, 50 Ext) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده محصول حاصل از PCR خالص‌سازی و سپس برای ترادف‌یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

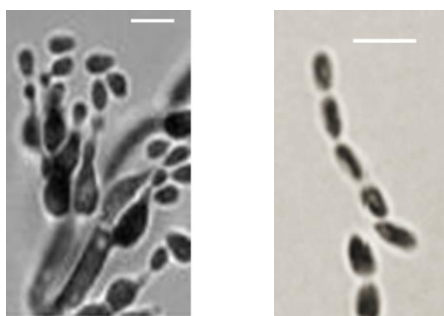
### تجزیه و تحلیل تبارشناختی جدایه‌ها براساس داده‌های مولکولی

فایل‌های کروماتوگرام با استفاده از نرم‌افزار Chromas (نسخه ۲,۶,۶) (Chromas version 2.6.6, 2018) ویرایش شدند. در مورد ناحیه ITS-rDNA ترادف‌یابی با استفاده از هر دو آغازگر مستقیم و معکوس صورت گرفت و ترادف‌ها بعد از ویرایش فایل‌های کروماتوگرام و انتخاب ترادف اجماع (Consensus sequence) با استفاده از نرم‌افزار Bioedit (Hall, 1999) به یک خوانش تبدیل شدند. در مجموع هر کدام از نواحی ژنومی مورد بررسی در سه تکرار ترادف‌یابی و ترادف اجماع به‌عنوان ترادف نهایی در تجزیه و تحلیل‌های تبارشناسی استفاده شد. یافتن ترادف‌های هومولوگ با استفاده از نرم‌افزار Blast در NCBI و بر اساس شاخص e-value صورت گرفت. ترادف‌های هومولوگ در فرمت FASTA ذخیره و سپس به همراه ترادف جدایه مورد مطالعه، زیرهم‌چینی با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و براساس پارامترهای از پیش تعیین شده انجام (Thompson et al., 1997) و ماتریس حاصله در فرمت FASTA ذخیره شد. در بررسی روابط تبارشناسی از هر سه روش NJ، MP و ML و از هزار تکرار برای ترسیم درخت بوت استرپ اجماع به منظور نشان دادن تاریخچه گروه‌های مورد مطالعه استفاده

شد. جایگاه‌های دارای فاصله یا داده گمشده حذف و در نهایت ۱۵۵ جایگاه در ترادف ITS-rDNA و ۲۹۶ جایگاه در ترادف  $\beta$ -tubulin مورد تجزیه و تحلیل تبارشناسی قرار گرفت.

## نتایج و بحث

قارچ بیمارگر حشرات *C. farinosa* در گذشته با نام *Paecilomyces farinosa* شناخته می‌شد که بعد از حدود ۳۰ سال از نام‌گذاری اولیه به جنس *Cordyceps* منتقل شد. در جدایه مورد بررسی کنیدیوم‌ها با میانگین طولی ۳/۸۳ و عرض ۱/۹۸ میکرومتر به شکل بیضوی و کنیدی‌زها با میانگین طولی ۴/۹۸ و عرض ۲/۲۱ دارای گلوبوز عریض در بخش قاعده‌ای می‌باشند. اشکال و نتایج مطالعه ریخت‌شناختی کنیدیوم و کنیدی‌زها در شکل ۱ و ۲ و جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی ریخت‌شناسی نشان داد که صفات جدایه KJ3 با توصیف ویژگی‌های گونه *Cordyceps farinosa* (Humber, 1997) تطابق کاملی دارد.



شکل ۱- تصویر سمت راست زنجیره کنیدیوم و چپ کنیدی‌زا و کنیدیوم‌های در حال رشد را در جدایه مورد مطالعه *Cordyceps farinosa* KJ3 نشان می‌دهد. مقیاس تصاویر برابر با ۵  $\mu\text{m}$  است.

**Fig. 1.** Conidia (Right) and conidiogenous cells (Left) of studied isolate of *Cordyceps farinosa* KJ3. Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

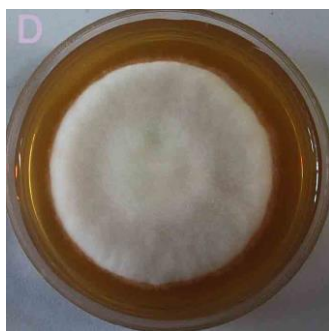
جدول ۱- مشخصات ریخت‌سنجی جدایه مورد مطالعه *Cordyceps farinosa* isolate KJ3

**Table 1.** Morphometric characters of *Cordyceps farinosa* isolate KJ3

Conidia		Conidiophore	
Length	Width	Length	Width
3.38±0.38 $\mu\text{m}$ *	1.98±0.13 $\mu\text{m}$	4.98±0.48 $\mu\text{m}$	2.21±0.17 $\mu\text{m}$

\* داده‌ها میانگین عددی ۳۰ اندازه‌گیری مستقل به همراه خطای استاندارد می‌باشند.

\* Data are the means ( $\pm$  SE) of 30 independent measurement.



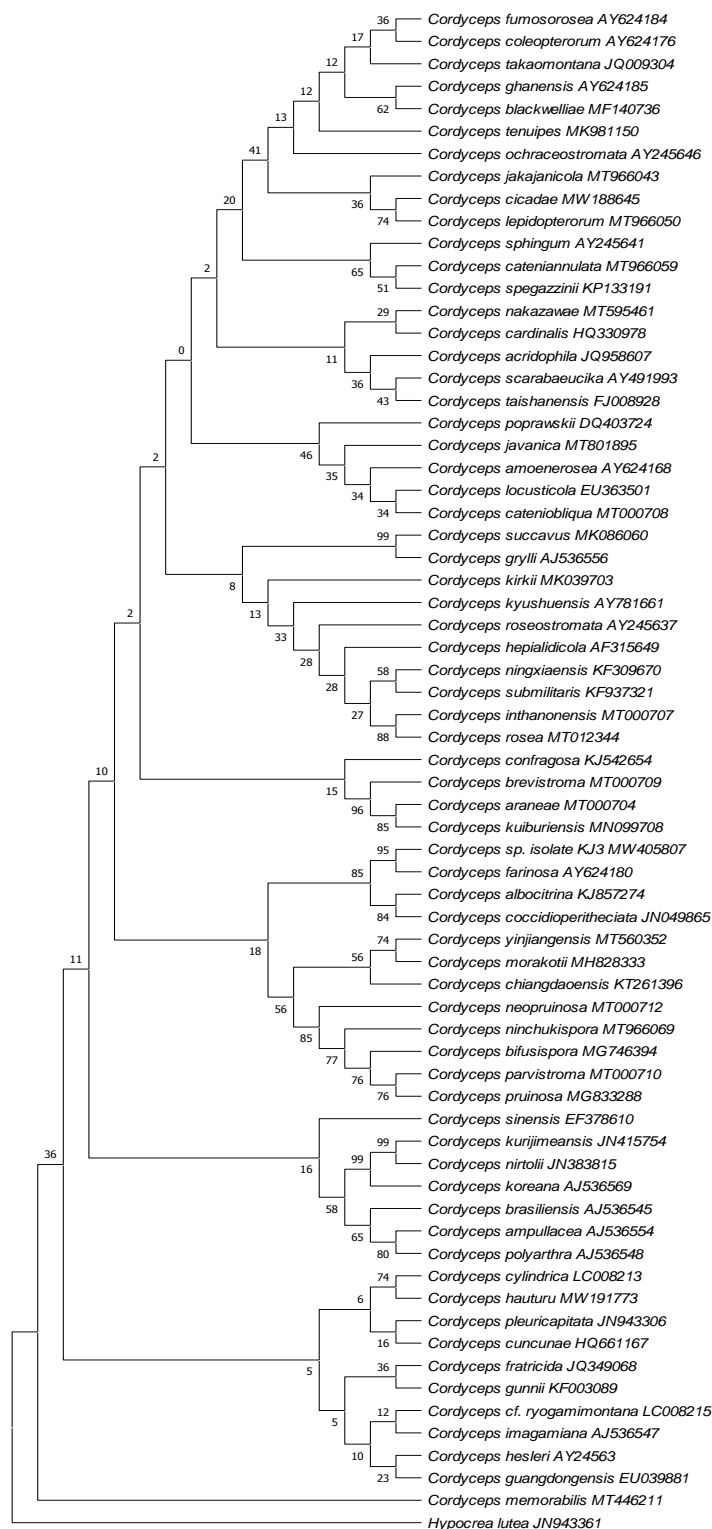
شکل ۲- اسپورزایی *Cordyceps farinosa* KJ3 روی محیط کشت SDAY

**Fig. 2.** Sporulation of *Cordyceps farinosa* KJ3 on SDAY media

طول قطعه تکثیر شده طی PCR برای ناحیه ITS، ۶۱۵ باز و برای ناحیه ژنی  $\beta$ -tubulin، ۳۵۵ باز بود. در درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ITS-rDNA، شاخص ثبات (Consistency Index) برابر با ۰/۴۳۷ و شاخص بازداری (Retention Index) ۰/۷ بود. این ارزش‌ها در خصوص درخت تبارشناسی مبتنی بر ژن بتاتوبولین به ترتیب ۰/۷۱۳ و ۰/۸۳۹ بود. هر چند که شاخص ثبات در درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ITS-rDNA به طور قابل توجهی کمتر از درخت تبارشناسی حاصل از ترادف ژن بتاتوبولین بوده و نشان دهنده پارسیمونی بیشتر می‌باشد، اما با توجه به رابطه عکس تعداد گونه و شاخص ثبات (Rohlf, 2005)، ارزش بالاتر شاخص ثبات و در نتیجه هموپلاسی کمتر در درخت تبارشناسی حاصل از ترادف ژن بتاتوبولین، می‌تواند ناشی از تعداد پایین گونه‌ها باشد. شاخص بازداری درخت حاصل از ترادف ژن بتاتوبولین نشان دهنده برازش بهتر داده‌ها با درخت تبارشناسی مربوطه در مقایسه با درخت حاصل از ITS-rDNA بود. این اختلاف نیز تا حدودی می‌تواند مربوط به تعداد کمتر گونه‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل باشد.

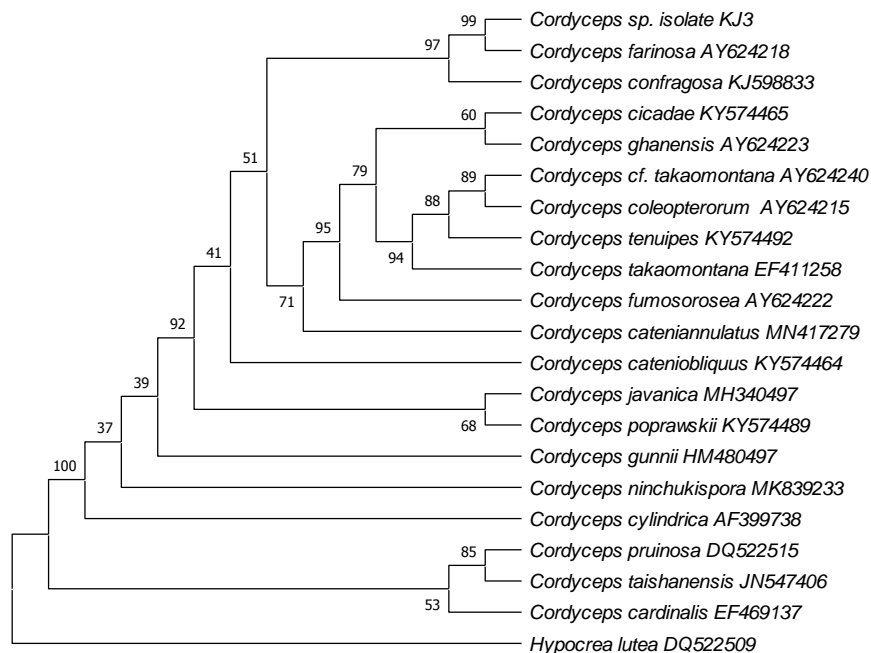
ارزش بوت استرپ گره‌ها در درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ITS-rDNA (شکل ۳) نشان داد که این ناحیه هرچند برای تفکیک گونه‌ها از کارایی قابل قبولی برخوردار می‌باشد اما در نشان دادن روابط گروه‌های تک نیایی در گره‌های داخلی عملکرد قابل قبولی ندارد. ناحیه ITS-rDNA یکی از نشانگرهای کارآمد در مطالعات تبارشناسی قارچ‌های *Cordyceps* spp. به تنهایی یا در ترکیب با دیگر نواحی ژنومی به شمار می‌آید (Tian et al., 2010, Li et al., 2020). در مقایسه، هر چند که به دلیل نبود داده‌ها، امکان به‌کارگیری گونه‌های مشابه در ترسیم درخت تبارشناسی بر اساس ترادف ژن بتاتوبولین میسر نبود، اما ارزش بوت استرپ در گره‌های خارجی و گره‌های داخلی به طور قابل توجهی بیشتر بود (شکل ۴). این وضعیت نشان دهنده کارایی بیشتر این ناحیه، حداقل بر اساس گونه‌های مورد بررسی در تجزیه و تحلیل، در مشخص نمودن روابط تبارشناسی و الگوی اشتقاق گونه‌ها می‌باشد.

در درخت تبارشناسی حاصل از ترادف ITS-rDNA، جدایه KJ3 با گونه *C. farinosa* در یک گروه تک نیایی قرار گرفت. ارزش بالای بوت استرپ (۰/۹۵) گره اجدادی گروه مذکور نشان دهنده میزان صحت بالای گروه بندی مورد نظر می‌باشد. در درخت یاد شده، گونه‌های *C. albocitrina* و *C. coccidioperitheciata* نیز به عنوان گونه‌های خواهری برای گونه *C. farinosa* ظاهر شدند (شکل ۳). در درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ژن بتاتوبولین نیز جدایه KJ3 با ارزش بوت استرپ بالا (۰/۹۹) با گونه *C. farinosa* در یک گروه تک نیایی قرار گرفت و گونه *C. confragosa* به عنوان گونه خواهری گروه مذکور ظاهر شد (شکل ۴).



شکل ۳- درخت اجماع تبارشناختی حاصل از تجزیه و تحلیل Maximum Parsimony ترادف ناحیه ITS-rDNA  
جدایه *Cordyceps farinosa* isolate KJ3 و ترادف‌های هومولوگ. گونه *Hypocrea lutea* به‌عنوان گروه خارجی  
در تجزیه و تحلیل منظور شده است. ارزش بوت استرپ در هر گره نمایش داده شده است.

**Fig. 3.** Consensus tree from the maximum parsimony analysis based on the sequence of the ITS-rDNA for *Cordyceps farinosa* isolate KJ3. *Hypocrea lutea* has been included as an outgroup in phylogenetic analysis. Bootstrap value has been shown in each node.

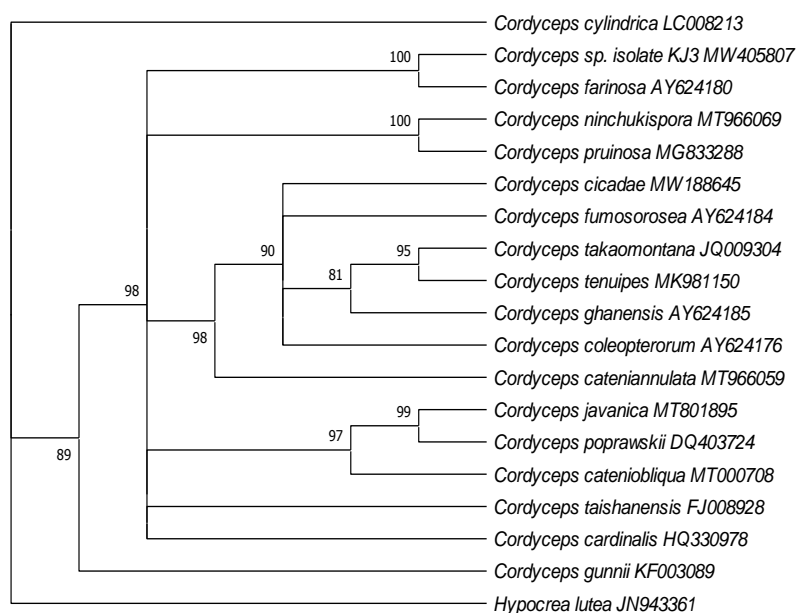


شکل ۴- درخت اجماع تبارشناختی حاصل از تجزیه و تحلیل Maximum Parsimony ترادف ژنی  $\beta$ -Tubulin جدایه *Cordyceps farinosa* KJ3 و ترادف‌های هومولوگ گونه *Hypocrea lutea* به‌عنوان گروه خارجی در تجزیه و تحلیل منظور شده است. ارزش بوت استرپ در هر گره نمایش داده شده است.

**Fig. 4.** Consensus tree from the maximum parsimony analysis based on the sequence of the  $\beta$ -tubulin for *Cordyceps farinosa* isolate KJ3. *Hypocrea lutea* has been included as an outgroup in phylogenetic analysis. Bootstrap value has been shown in each node.

با هدف مقایسه کارایی ترادف‌های ITS-rDNA و  $\beta$ -Tubulin در مطالعات تبارشناختی جنس *Cordyceps*، درختان تبارشناسی با تعداد و گونه‌های مشابه برای نواحی مذکور ترسیم شد. در درخت تبارشناسی حاصل از ترادف ITS-rDNA، شاخص ثبات برابر با ۰/۶۰ و شاخص بازداری ۰/۶۹ بود. این ارزش‌ها در درخت مبتنی بر  $\beta$ -Tubulin به ترتیب ۰/۷۳ و ۰/۸۴ بود. نتایج نشان داد که صرف نظر از تعداد جایگاه‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل تبارشناسی، برآزش داده‌های ترادف  $\beta$ -Tubulin روی درخت تبارشناسی بهتر و نیازمند هوموپلاسی کمتری می‌باشد. مقایسه توپولوژی نیز نشان داد که میزان پلیتومی (Polytomy) در درخت تبارشناسی حاصل از ترادف  $\beta$ -Tubulin به طور قابل توجهی کمتر بوده و بر این اساس، روابط گونه‌ها و گروه‌های تک‌نیایی نسبت به هم از وضوح بیشتری برخوردار می‌باشد. در کل، در درخت تبارشناسی حاصل از ترادف ITS-rDNA تعداد هشت شاخه و در درخت مبتنی بر ترادف  $\beta$ -Tubulin تنها سه شاخه به‌صورت پلیتومی روی درخت قرار دارد (شکل ۵).



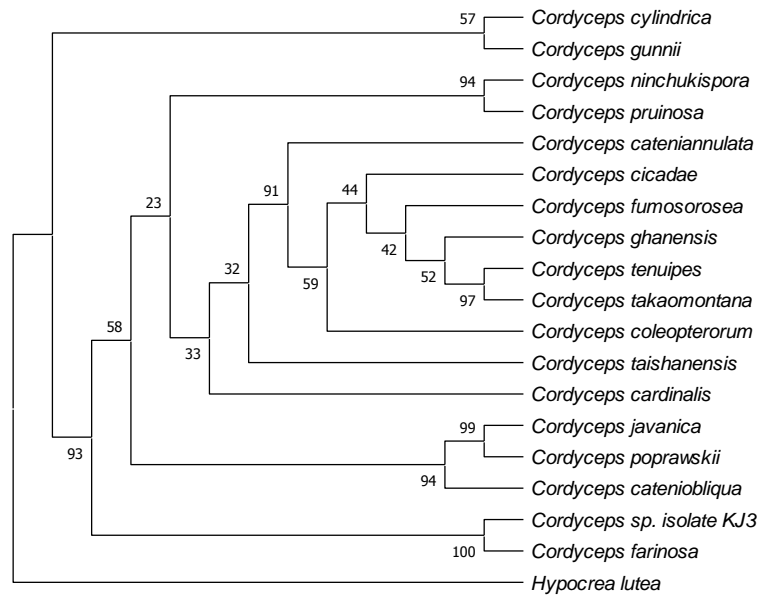


**شکل ۵-** درخت اجماع تبارشناختی حاصل از تجزیه و تحلیل Maximum Parsimony ترادف ژنی ITS-rDNA جدایه *Cordyceps farinosa* KJ3 و ترادف‌های هومولوگ گونه *Hypocrea lutea* به‌عنوان گروه خارجی در تجزیه و تحلیل منظور شده است. ارزش بوت استرپ در هر گره نمایش داده شده است.

**Fig. 5.** Consensus tree from the maximum parsimony analysis based on the sequence of the ITS-rDNA for *Cordyceps farinosa* isolate KJ3. *Hypocrea lutea* has been included as an outgroup in phylogenetic analysis. Bootstrap value has been shown in each node.

به منظور دستیابی به بهترین برآورد از روابط نیایی گونه‌ها، تجزیه و تحلیل تبارشناختی با استفاده از ترکیب ترادف‌های ITS-rDNA و  $\beta$ -Tubulin انجام شد. در درخت حاصل از تلفیق هر دو مکان ژنی، شاخص ثبات برابر با ۰/۶۷ و شاخص بازداری ۰/۶۳ بود که نشان دهنده برازش بهتر داده‌ها روی درخت و هوموپلاسی کمتر آن‌ها در مقایسه با درخت تبارشناسی مبتنی بر ترادف ITS-rDNA به تنهایی می‌باشد. علیرغم پلیتومی کمتری آن در مقایسه با درخت تبارشناسی حاصل از ترادف  $\beta$ -Tubulin، درخت ترسیم شده از تلفیق ترادف هر دو ناحیه ژنومی مورد مطالعه از شاخص ثبات و بازداری کمتری برخوردار بود.

فاصله ژنتیکی دوبدو (Pairwise genetic distance) جدایه KJ3 با نزدیکترین گونه‌ها بر اساس ترادف‌های ITS-rDNA و  $\beta$ -Tubulin در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. چنانچه نشان داده شده فاصله دوبدوی جدایه KJ3 از *C. farinosa* AY624180 صفر و گونه‌های *C. albocitrina* و *C. coccidioperitheciata* به ترتیب با ۰/۰۲۱ و ۰/۰۲۳ کمترین فاصله را با جدایه مورد بررسی نشان می‌دهند. این نتایج کاملاً با توپولوژی درخت تبارشناسی انطباق کامل دارد. در خصوص ترادف  $\beta$ -Tubulin نیز تطابق کاملی بین نتایج فواصل دوبدو و توپولوژی درخت ثبت شد.



**شکل ۶-** درخت اجماع تبارشناختی حاصل از تجزیه و تحلیل Maximum Parsimony تلفیق ترادف ژنی ITS- rDNA و  $\beta$ -Tubulin جدایه *Cordyceps farinosa* KJ3 و ترادف‌های هومولوگ. گونه *Hypocrea lutea* به‌عنوان گروه خارجی در تجزیه و تحلیل منظور شده است. ارزش بوت استرپ در هر گره نمایش داده شده است.

**Fig. 6.** Consensus tree from the maximum parsimony analysis based on the combination sequences of the ITS-rDNA and  $\beta$ -Tubulin for *Cordyceps farinosa* isolate KJ3. *Hypocrea lutea* has been included as an outgroup in phylogenetic analysis. Bootstrap value has been shown in each node.

جدول ۲- فاصله ژنتیکی برخی از گونه‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل تبارشناسی *Cordyceps sp.* isolate KJ3

**Table 2.** ITS-rDNA sequence based pairwise genetic distances of *Cordyceps farinosa* isolate KJ3 with included species/isolates in phylogenetic analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 <i>Cordyceps sp.</i> isolate KJ3 MW405807	0.000										
2 <i>Cordyceps farinosa</i> AY624180	0.021	0.021									
3 <i>Cordyceps albocitrina</i> KJ857274	0.023	0.023	0.002								
4 <i>Cordyceps coecidioperithecia</i> JN049865	0.112	0.112	0.086	0.089							
5 <i>Cordyceps yinjiaensis</i> MT560352	0.120	0.120	0.094	0.096	0.011						
6 <i>Cordyceps morakoti</i> MH828333	0.112	0.112	0.086	0.089	0.017	0.026					
7 <i>Cordyceps parvistruma</i> MT000710	0.112	0.112	0.086	0.089	0.017	0.026	0.004				
8 <i>Cordyceps neoprunosa</i> MT000712	0.122	0.122	0.096	0.099	0.013	0.023	0.021	0.021			
9 <i>Cordyceps chiangdaoensis</i> KT261396	0.112	0.112	0.086	0.089	0.017	0.026	0.004	0.000	0.021		
10 <i>Cordyceps nihchukispora</i> MT966069	0.109	0.109	0.086	0.089	0.021	0.030	0.008	0.004	0.026	0.004	
11 <i>Cordyceps bifasispora</i> MG746394	0.112	0.112	0.086	0.089	0.017	0.026	0.004	0.004	0.021	0.004	0.008
12 <i>Cordyceps pruinosa</i> MG833288											

جدول ۳- فاصله ژنتیکی برخی از گونه‌های مورد استفاده در تجزیه و تحلیل تبارشناسی *Cordyceps sp.* isolate KJ3

**Table 3.**  $\beta$ -tubulin sequence based pairwise genetic distances of *Cordyceps farinosa* isolate KJ3 with included species / isolates in phylogenetic analysis

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 Isolate KJ3 sp. <i>Cordyceps</i>	0.000									
2 <i>Cordyceps farinosa</i> AY624218	0.047	0.047								
3 <i>Cordyceps confingosa</i> KJ598833	0.112	0.112	0.100							
4 <i>Cordyceps cicadae</i> KY574465	0.104	0.104	0.100	0.013						
5 <i>Cordyceps shanensis</i> AY624223	0.112	0.112	0.100	0.016	0.010					
6 <i>Cordyceps cf. takanomiana</i> AY624240	0.112	0.112	0.100	0.016	0.010	0.000				
7 <i>Cordyceps takanomiana</i> EF411258	0.116	0.116	0.104	0.019	0.013	0.003	0.003			
8 <i>Cordyceps tenuipes</i> KY574492	0.116	0.116	0.104	0.019	0.013	0.003	0.003	0.006		
9 <i>Cordyceps coleopterorum</i> AY624215	0.096	0.096	0.092	0.023	0.016	0.013	0.013	0.016	0.016	
10 <i>Cordyceps fimosorosa</i> AY624222	0.088	0.088	0.080	0.060	0.053	0.050	0.050	0.053	0.053	0.043
11 <i>Cordyceps carentanulatus</i> MN417279										

در این بررسی جدا به KJ3 بر اساس ویژگی‌های ریختی به عنوان گونه *Cordyceps farinosa* شناسایی شد. مطالعات تکمیلی مبتنی بر تجزیه و تحلیل تبارشناسی نواحی ITS-rDNA و  $\beta$ -tubulin به تنهایی و در ترکیب با هم و فواصل دودوی ژنتیکی نیز صحت شناسایی مبتنی بر ویژگی‌های ریختی را تایید کرد. مقایسه توپولوژی درختان تبارشناسی از نظر شاخص ثبات، شاخص بازداری و توپولوژی نشان داد که ترادف  $\beta$ -tubulin در مقایسه با ITS-rDNA و نیز ترکیب هر دو مکان ژنی از کارایی بیش‌تری در نشان دادن روابط گروه‌های تک نیایی بویژه در گره‌های داخلی برخوردار می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته حشره‌شناسی کشاورزی نویسنده اول بوده و مولفین از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان از نظر حمایت مالی این تحقیق کمال تشکر و تقدیر را دارند.

## References

- Chromas version 2.6.6**, (2018) South Brisbane, Queensland, Australia: Technelysium Pty Ltd.
- Eriksson, O., Baral, H. O., Currah, R. S., Hansen, K., Kurtzman, C., Rambold, G. & Laesoe T.** (2004) Outline of Ascomycota - 2004. *Myconet* 10, 1-99.
- Ghazavi, M., Abaii, M. & Zangeneh, S.** (2006) New Records of Some Entomopathogenic Fungi from Iran. *Rostaniha* 6(2), 119-130.
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C.** (1995) Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from Filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1323-1330.
- Hall, T. A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41, 95-98.
- Humber, R. A.** (1997) Fungi: Identification. In L. A. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology* 135-185 pp. San Diego: Academic Press.
- Kendrick, B.** (2003) Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. *Mycologist* 17, 17-19.
- Li, Y. P., Chen, W., Liang, J. D. & Liang, Z. Q.** (2020) *Cordyceps yinjiangensis*, a new ant-pathogenic fungus. *Phytotaxa* 453, 284-292.
- Meyling, N. V.** (2008) Ecology of entomopathogenic fungi in agroecosystems, Available from: [http://topics.scirus.com/Ecology\\_of\\_entomopathogenic\\_fungi\\_in\\_agroecosystems.html](http://topics.scirus.com/Ecology_of_entomopathogenic_fungi_in_agroecosystems.html) (Accessed 30 December 2020).
- Parsi, F.** (2019) Entomopathogenic Fungi Collected from Sunn Pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae), Overwintering Sites in Central Iran. *Journal of Biology and Today's World* 8 (10), 210.
- Rehner, S. A. & Buckley, E.** (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia* 97(1), 84-98.
- Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G. H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L. & Humber, R. A.** (2011) Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5), 1055-1073.
- Rohlf, F.** (2005) J. Felsenstein, Inferring Phylogenies, Sinauer Assoc., 2004, pp. xx + 664. *Journal of Classification* 22, 139-142.
- Samson, R. A., Evans, H. C. & Latge, J. P.** (1988) *Atlas of entomopathogenic fungi*, Springer Heidelberg, Berlin.

- Shipp, J. L., Zhang, Y., Hunt, D. W. A. & Ferguson, G.** (2003) Influence of humidity and greenhouse microclimate on the efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) for control of greenhouse arthropod pests. *Journal of Environmental Entomology* 32, 1154-1163.
- Sung, G. H., Hywel-Jones, N., Sung, J. M., Luangsa-Ard, J., Shrestha, B. & Spatafora, J.** (2007) Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol. Studies in mycology* 57: 5-59.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G.** (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24), 4876-4882.
- Tian, L. H., Hu, B., Zhou, H., Zhang, W. M., Qu, L. & Chen, Y. Q.** (2010) Molecular phylogeny of the entomopathogenic fungi of the genus *Cordyceps* (Ascomycota: Clavicipitaceae) and its evolutionary implications. *Journal of Systematics and Evolution* 48, 435-444.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 in Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (Eds) *PCR Protocols: Genes for phylogenetics*. San Diego: Academic Press.
- Zhu, H., Qu, F. & Zhu, L.** (1993) Isolation of genomic DNA from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Research* 21, 5279-5280.
- Zimmermann, G.** (1986) The 'Galleria bait method' for detection of entomopathogenic fungi in soil. *Journal of Applied Entomology* 102, 213-215.
- Zimmermann, G.** (2008) The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces filmosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. *Biocontrol Science and Technology* 18, 865-901.