مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره هجدهم / زمستان ۱۳۹۲ /۱۲۶-۱۱۳

رمزینه‌گذاری داکسی ریبونوکلئیک اسید (DNA Barcoding): افقی جدید در شناسایی مولکولی قارچ‌های پاتوژن (مقاله مروری)

مهدی ارزنلو[۱]، هاله دخانچی[۲]، مهدی داوری[۳]، صادق خداویسی[۴،۵]، حمید بدلی[۶]

۱.دانشیار قارچ شناسی و بیماری‌های گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲. کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳. استادیار قارچ شناسی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۴. مربی قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۵. دانشجوی دکتری تخصصی قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۶. استادیار قارچ شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات قارچ های مهاجم و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران. (مولف مسوول) تلفن ثابت:۳۵۴۲۴۷۵-۰۱۵۱، badalii@yahoo.com

چکیده

تعداد گونه‌های قارچی موجود حدود ۱/۵ میلیون عدد برآورد شده است که تا امروز کمتر از ۱۰ درصد آنها توصیف شده‌اند. با پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی و توسعه فناوری‌هایی مثل توالی‌یابی ژنی و ژنومی، کشف و شناسایی گونه‌های جدید در گروه‌های مختلف موجودات زنده به‌ویژه قارچ‌ها روند افزایشی به خود گرفته است. با توجه به ناکارآمدی روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی برای شناسایی گونه‌های قارچی، استفاده از تکنیکهای جدید مبتنی بر داده‌های DNA جایگاه خاصی را در شناسایی سریع و دقیق گونه‌های قارچی پیدا کرده است. رمزینه‌گذاری یا بارکدگذاری DNA در مرکز ثقل راهکارهای نوین برای شناسایی قارچ‌ها واقع شده است و از سابقه ۱۰ ساله در شناسایی قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها برخوردار می‌باشد. ناحیه فاصله انداز بین ژنی اپرون RNA ریبوزومی (ITS- rDNA) به عنوان یک رمزینه یا بارکد مناسب مورد توجه قرار گرفته است. کارآیی داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA در شناسایی اغلب گروه‌های قارچی باعث شده است که استفاده از این ناحیه به عنوان رمزینه استاندارد در شناسایی قارچ‌ها مورد توافق قارچ‌شناسان قرار گیرد. با وجود این به نظر می‌رسد که ناحیه ITS-rDNA به عنوان رمزینه اولیه برای شناسایی قارچ‌ها در حد جنس و یا گروه گونه‌ای مورد استفاده واقع شود و شناسایی دقیق در حد گونه بسته به گروه قارچی مورد مطالعه بر اساس رمزینه‌های ثانویه انجام شود. با عنایت به طبیعت پلئومورفیک قارچ‌ها استفاده از رمزینه‌گذاری DNA برای شناسایی قارچ‌ها از درجه اهمیت بالاتری برخوردار می‌باشد و در این راستا تاکنون صدها هزار توالی رمزینه مرجع برای هزاران گونه از موجودات زنده از طریق پروژه‌های رمزینه‌گذاری DNA ایجاد شده است و تلاش‌های بعدی دانشمندان در راستای مدیریت داده‌های رمزینه و اتوماتیزاسیون رمزینه‌گذاری DNA جهت تسریع فرآیند شناسایی توسط کاربران نهایی خواهد بود.

واژه های کلیدی: *Cytochrome oxidase 1*، ITS- rDNA، *β–tubulin*، شناسایی گونه، مفهوم گونه مورفولوژیک.

وصول مقاله:۹۱/۵/۱ اصلاحیه نهایی:۹۱/۱۰/۱۱ پذیرش:۹۱/۱۰/۳۰

مقدمه

شناسایی و طبقه‌بندی گونه‌ها از مهم‌ترین بخش‌های آرایه‌بندی[۱] و مطالعات زیستی است. شناسایی صحیح گونه‌ها، دریچه‌های اطلاعاتی مفیدی را پیرامون هر موجود زنده از قبیل نقش‌های اکولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و سود و زیان‌های اجتماعی آن می‌گشاید (۲و۱). آرایه‌بندی شامل دو بخش طبقه‌بندی و

1 -Taxonomy

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

نام‌گذاری است و هدف آن گروه‌بندی موجودات زنده به واحدهای طبیعی می‌باشد که توصیف تنوع زیستی و شناسایی گونه را امکان پذیر کرده و در ضمن منعکس کننده روابط خویشاوندی بین گروه‌های مختلف موجودات زنده می‌باشد (۳و۲). هدف متخصصین آرایه‌بندی، ایجاد یک نظم قابل قبول در بین گروه‌های ناهمگن موجودات زنده برای سهولت در امر برقراری ارتباط بین گروه‌ها و نیز ایجاد روش‌هایی است که توسط دیگران قابل استفاده و آزمایش باشد. برای نیل به این هدف، دانشمندان راهکارهای مختلفی را مورد استفاده قرار داده‌اند که عموما از این راهکارها تحت عنوان مفاهیم گونه یاد می‌شود. در منابع علمی، تقسیم‌بندی‌های متعددی از مفاهیم گونه ذکر شده است که از بین آنها می‌توان به مفاهیم تئوریک[1] و مفاهیم کاربردی[2] گونه اشاره کرد (۵-۳). مفاهیم کاربردی دارای ارزش شناسایی و کاربردی می‌باشند که از این بین می‌توان به مفهوم گونه مورفولوژیک[3]، گونه بیولوژیک[4] و مفهوم گونه فیلوژنتیک[5] اشاره کرد (۴و۲). با وجود اینکه مفهوم فیلوژنتیک گونه نیز تحت تاثیر متغیرهای مختلف از قبیل ناحیه یا نواحی ژنومی مورد استفاده برای برآورد روابط خویشاوندی بین گروه‌های قارچی مختلف می‌باشد، بنابراین الگوریتم مورد استفاده برای ترسیم درخت فیلوژنتیک و برخی مؤلفه‌های دیگر قرار می‌گیرد، ولی در مقایسه با راهکارهای دیگر نتایج قابل اعتماد و تکرار پذیرتری را ایجاد می‌نماید، بنابراین در سال‌های اخیر از اقبال عمومی بین قارچ شناسان برخوردار بوده است و به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵-۴).

در تاریخ زیست‌شناسی، دانشمندان از داده‌های مختلفی برای شناسایی موجودات زنده استفاده کرده‌اند که از بین آنها می‌توان به داده‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیولوژیک اشاره کرد. نیاز به دانش تخصصی یکی از اصلی‌ترین عوامل محدود کننده در استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی برای شناسایی صحیح و دقیق گونه‌های قارچی می‌باشد و در کنار این فاکتور، عوامل ناشی از برخی ویژگی‌های منحصر به فرد قارچ‌ها (نیاز به محیط‌های کشت اختصاصی، شرایط نگهداری ویژه، سرعت رشد محدود و غیره) نیز از مشکلات دیگر روش‌های ریخت‌شناختی به شمار می‌رود. با پیشرفت‌های اخیر در زیست‌شناسی مولکولی و توسعه روش‌های مولکولی بر پایه DNA، دانشمندان از این روش‌ها برای شناسایی سریع و دقیق قارچ‌ها بهره جسته‌اند. روش‌های مولکولی شناسایی قارچ‌ها عمدتا بر اساس تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و یا تکنیک‌های مبتنی بر این واکنش استوار می باشند که به صورت رایج در کلنیک‌های پزشکی، آزمایشگاه‌های بیماری‌شناسی گیاهی، و ... برای شناسایی گونه‌های قارچی با اهمیت اقتصادی بالا در پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده واقع شده‌اند (۱۵و۱۴و۱۱-۸و۶) از روش‌های مولکولی دیگر می‌توان به تکنیک هیبریداسیون DNA[6]، RFLP[2] و AFLP[3] اشاره نمود (۱۴). با توجه به روند افزایشی مواجهه با گونه‌های قارچی بیماری‌زا در کشاورزی، عفونت‌های بیمارستانی و استفاده از گونه‌های مفید قارچی در صنعت، داروسازی، زیست‌فناوری و علوم وابسته و کشف گونه‌های پنهان (Cryptic species) که به خاطر فقدان ویژگی‌های بارز مورفولوژیک از همدیگر بر اساس معیارهای ریخت‌شناختی از یکدیگر قابل تفکیک نیستند، اهمیت استفاده از روش‌های دقیق‌تر و با کارآمدی بالا در تفکیک گونه‌های قارچی دو چندان می‌نماید (۱۵و۱۴و۷و۴و۲). یکی از روش‌های نوین برای شناسایی گونه، استفاده از اطلاعات توالی DNA است که اهمیت زیادی در قارچ‌شناسی معاصر دارد. با پیشرفت‌های اخیر در

1 -Theoretical species concept
2 -Operational species concept
3 -Morphological species concept
4 -Biological species concept
5 -Phylogenetic species concept

6 - DNA Hybridization
2- Restriction Fragment Length Plymorphism
3- Amplified Fragment Length Polymorphism

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

فناوری‌های توالی‌یابی از جمله روش پایروسکوئنسینگ، توالی‌یابی نواحی ژنی با سرعت عمل و دقت بالا انجام می‌گیرد. استفاده از داده‌های توالی در شناسایی قارچ‌ها به‌ویژه برای افراد غیر متخصص در زمینه شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی قارچ‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد. اندیشه استفاده از سیستم شناسایی مولکولی استاندارد برای شناسایی گونه‌ها مربوط به دهه ۱۹۹۰ است (۱۶و۱). در این سال‌ها اختراع روش PCR و تکثیر ژن‌های موجودات زنده و به دنبال آن توسعه تکنیک‌های توالی‌یابی و تعیین توالی قسمت‌های مختلف ژنومی و امکان مقایسه‌ی آنها افق جدیدی برای حل مشکلات فراروی تاکسونومیست‌ها ایجاد کرد. با دسته بندی توالی‌ها و مقایسه آنها با استفاده از روش‌های آماری و بیوانفورماتیک، درخت فیلوژنتیک ترسیم می‌شود و روابط خویشاوندی موجودات زنده تعیین می‌شود. برای این منظور از DNA ژنومی، میتوکندری، کلروپلاست و غیره استفاده می‌گردد. رمزینه‌گذاری DNA یک سیستم شناسایی مبتنی بر استفاده از داده‌های توالی نوکلئوتیدی ترجیحاً یک ژن و یا تعداد معدودی از نواحی ژنی برای شناسایی سریع و دقیق گونه‌های موجودات زنده به شمار می‌رود. به دنبال مشخص شدن موقعیت فیلوژنتیک یک گونه قارچی بر اساس داده‌های توالی نوکلئوتیدی روی درخت فیلوژنتیک و مقایسه توالی گونه هدف با گونه‌های دیگر با درجه تشابه بالا، طراحی رمزینه DNA برای گونه مورد نظر امکان‌پذیر خواهد بود (۱). در واقع رمزینه‌گذاری DNA به شناسایی گونه‌ها با استفاده از داده‌های توالی یک یا تعداد بیشتری از ژن‌ها می‌پردازد. رمزینه‌گذاری DNA، صرفاً آرایه‌بندی نیست بلکه روشی با توان عملیاتی بالا، کارآمد و دقیق برای شناسایی دقیق گونه‌ها در همه شاخه‌ها است که بر اساس آن شناسایی و در نهایت شمارش تمام سازواره‌ها[1] امکان‌پذیر می‌شود. در واقع رمزینه‌گذاری DNA متمم آرایه‌بندی، فیلوژنی مولکولی و ژنتیک جمعیت است (۱۷و۱۶و۲و۱). رمزینه گذاری DNA از این نظر که از داده‌های توالی برای شناسایی آرایه‌ها استفاده می‌شود با فیلوژنی مولکولی مشابهت دارد، ولی هدف اصلی در فیلوژنی ملکولی، مطالعه و بازسازی روابط خویشاوندی بین موجودات زنده در سطوح مختلف تاکسونومیک (گونه، جنس، خانواده و راسته و ...) بر اساس داده‌های توالی می‌باشد و در این راستا هر چه تعداد ژن‌های مورد استفاده بیشتر باشد فهم واقع بینانه‌تری از روابط خویشاوندی در سطح مختلف تاکسونومی حاصل می‌شود، حتی با پیشرفت‌هایی که سال‌های اخیر در فناوری‌های توالی‌یابی ایجاد شده است، مقایسه توالی‌های ژنومی در مطالعات فیلوژنتیکی دور از انتظار نیست. در حالی‌که هدف اصلی در رمزینه‌گذاری DNA شناسایی مطمئن آرایه‌ها بر اساس داده‌های توالی می‌باشد و این داده‌ها عموما فاقد کارآیی فیلوژنتیک در سطوح بالای تاکسونومی هستند.

روش مطالعه

در مقاله حاضر، جهت بررسی نقاط قوت و ضعف راهکارهای مبتنی بر ریخت‌شناسی و مولکولی رایج در شناسایی قارچ‌ها، سعی شده با استفاده از جستجوی تازه‌ترین مقالات مرتبط از بانک‌های اطلاعاتی خارج کشور نظیر Pub med Medline, Scopus, Google scholar, Elsevier databases و بانک‌های اطلاعاتی داخل کشور مثل Iran doc ، Iran medex، Magiran، SID و MEDLIB با استفاده از واژه‌های کلیدی از قبیل رمزینه گذاری، ژن‌های LSU rDNA، SSU rDNA، Internal Transcribed Spacer (ITS-rDNA)، *Translation Elongation Factor 1-alpha* (*TEF-1α*)، *RPB1*، *RPB2*، *β-tubulin*، *Acitn*، *Calmodulin* و *HistonH3*، شناسایی گونه، مفهوم گونه مورفولوژیک از سال های ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۲ با مروری جامع بر روی اساس رمزینه‌گذاری دی‌ان‌ای (Barcoding

1 - Organisms

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

DNA) که افقی جدید در شناسایی مولکولی قارچ‌های پاتوژن می باشد، پیشرفت‌های اخیر در این زمینه مورد بحث قرار گیرد.

از آرایه‌بندی سنتی تا آرایه‌بندی مولکولی

استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی در شناسایی، آرایه‌بندی و برآورد روابط فیلوژنی موجودات زنده از سابقه ۳۰۰ ساله برخوردار می‌باشد که در منابع از آن تحت عنوان شناسایی مورفولوژیک گونه یاد می‌شود. اساس راهکار ریخت‌شناسی این است که تیپ‌های مورفولوژیک و یا افراد می‌توانند نمایانگر تفاوت‌ها در سطح همه افراد گونه باشند. مفهوم مورفولوژیک گونه طبق تعریف لینه[1] دارای دو ویژگی اصلی است، بدین‌ترتیب که اولاً صفات ریخت‌شناسی بین افراد یک گونه ثابت (همگن بودن) هستند و ثانیاً بین گونه‌ها تفاوت‌های بارزی را نشان می‌دهند. طبق نظر تایلور و همکاران (۵) نقطه قوت مفهوم مورفولوژیک گونه، قابلیت به‌کارگیری آن در مورد هر آرایه قارچی و استفاده وسیع و با سابقه طولانی آن می‌باشد (۱۸و۱۰و۴-۲).

به‌طور سنتی ویژگی‌های فنوتیپیک یعنی خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی در شناسایی قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما این ویژگی‌ها به‌ویژه ریخت‌شناسی به شدت تحت تاثیر شرایط محیطی واقع می‌شوند و بنابراین فوق‌العاده متغیر می‌باشند. تفاوت‌های موجود در ویژگی‌های ریخت‌شناختی (ترجیحاً چندین ویژگی) جهت شناسایی و توصیف گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵و۱۱و۱۰و۶و۴و۲). یکی دیگر از محدویت‌های عمده در استفاده از صفات ریخت‌شناختی در شناسایی اغلب گروه‌های قارچی این است که تعداد خصوصیات قابل تشخیص به مراتب کمتر از تعداد گونه‌های شناخته شده برای هریک از جنس‌های قارچی و یا تعداد گونه‌های قارچی در یک جنس می‌باشد. نمونه‌های متعددی از این محدودیت‌ها توسط قارچ‌شناسان تجربه شده است که از آن جمله می‌توان به مشکلات موجود در شناسایی گونه‌های *فوزاریوم* بر مبنای داده‌های ریخت‌شناختی اشاره کرد. نکته مهم این است که این جنس فاقد ویژگی‌های ریخت‌شناختی کافی جهت تفکیک رضایت‌بخش گونه‌ها می‌باشد، بنابراین برخی معتقدند که تعداد گونه‌ها در این جنس بیشتر از تعداد ویژگی‌های ریخت‌شناختی موجود برای شناسایی گونه‌ها می‌باشد (۱۸و۱۵). برخی اوقات هم، جدایه‌های متعلق به یک گونه ممکن است تفاوت‌هایی را در برخی ویژگی‌های ریخت‌شناختی از جمله اندازه و رنگ پرگنه، شکل و اندازه ماکروکنیدی و تشکیل کلامیدوسپور نشان دهند.

با معرفی و استفاده از تکنیک‌های مولکولی، آرایه‌بندی گونه‌های *فوزاریوم* به موضوع بحث برانگیزی تبدیل شده است. به‌ویژه تلفیق مفهوم گونه فیلوژنتیک با داده‌های DNA منجر به توصیف موج جدیدی از گونه‌های جدید گردیده که شامل تعدادی از گونه‌های سیبلینگ[2] یا هم‌زاد (هم‌نیا یا خواهری) می‌باشد. شناسایی گونه‌های هم‌زاد بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی غیر ممکن می‌باشد (۱۸و۱۵و۴و۱). مثلا در داخل گونه مرکب *Fusarium graminearum* تاکنون ۱۵ گونه فیلوژنتیک شناسایی شده است که تفکیک این گونه‌ها از یکدیگر بر اساس داده‌های ریخت‌شناختی امکان پذیر نیست (۱۹و۱۵). عدم کارآیی صفات مورفولوژیک در تفکیک موفق گروه‌های قارچی در مورد شبه مخمرهای سیاه[3] نیز تجربه شده است. اصطلاح مخمرهای سیاه معمولا برای توصیف قارچ‌های تولید کننده رنگدانه ملانین که علاوه بر فاز میسلیومی دارای یک فاز مخمری در محیط کشت می باشند، اطلاق می‌شود (۱۹) و به عنوان عوامل بیماریزای انسان و موجودات زنده

1 - Linne

2 - Sibling species

3 - Black yeast like fungi

2 - Bioweathering biodegradation and bioremidiation

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

دیگر به شمار می‌روند و مخصوصاً باعث عفونت‌زایی در مغز و سایر اندام‌ها در افراد با سیستم ایمنی ضعیف می‌شوند که گاهی می‌توانند کشنده نیز باشد (۱۸و۱۰و۴و۳و۱). همچنین این قارچ‌ها در ایجاد فرسایش زیستی[1] و تخریب سنگ‌های زینتی و آثار باستانی (۲۰) نقش دارند. از طرف دیگر نقش مثبت مخمرهای سیاه در زیست سالم‌سازی[3] محیط زیست و تجزیه آلاینده‌های نفتی ثابت شده است (۲۲و۲۱). ارزنلو و همکاران (۷) نشان دادند که جنس *Ramichloridium* که حدود و ثغور آن بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی تعیین شده است، یک گروه ناهمگن از قارچ‌ها را در بر می‌گیرد. نتایج بررسی این محققین نشان داد که گونه‌های بیماری‌زای انسان که قبلا در جنس *Ramichloridium* طبقه‌بندی شده بود، متعلق به جنس *Rhinocladiella* در راسته *Chaeothyrilaes* می‌باشند، در حالی‌که جنس *Ramaichloridium* متعلق به راسته *Capnodilaes* می‌باشد (۱۳و۷). در مورد گروه‌های دیگر قارچی متعلق به مخمرهای سیاه از قبیل *Cladophialophora* و *Exophiala* نیز شناسایی گونه‌ها تنها با اتکاء به صفات مورفولوژیک امکان‌پذیر نمی‌باشد (۱۳-۱۰و۷). مشکلات موجود در شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی باعث روی آوردن قارچ‌شناسان به استفاده از روش‌های مولکولی در شناسایی قارچ‌ها گردید. با ابداع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز امکان تکثیر نواحی ژنی از نمونه‌های DNA فراهم گردید. بنابراین از طریق استخراج DNA از کشت‌های قارچی امکان تکثیر بخش‌هایی از ژنوم برای اهداف تشخیصی فراهم گردید (۱۴و۲). به‌دنبال آن تکنیک های متعدد مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت وسیع مورد استفاده قرار گرفت و حتی در برخی موارد تشخیص و کمیت‌سنجی گونه های قارچی به صورت مستقیم از نمونه‌های آلوده (نمونه‌های گیاهی آلوده، نمونه‌های خونی، هوا، خاک و...) امکان‌پذیر شد (۱۵و۱۴و۹و۶). ارزنلو و همکاران (۶) با به کارگیری فناوری TaqMan Real Time Assay، گونه‌های *Mycosphaerella* دخیل در بیماری مرکب سیگاتوگای موز را به صورت مستقیم از نمونه‌های آلوده گیاه موز تشخیص داده و مورد کمیت‌سنجی قرار دادند. رهیافت‌های مولکولی در مقایسه با روش‌های سنتی از سرعت، دقت عمل و حساسیت بالاتری برخوردار هستند و در این روش‌ها خطرات کمتری سلامتی محققین و پرسنل آزمایشگاه را موقع کار با نمونه‌های آلوده تهدید می‌کند (۱۴). در حال حاضر داده‌های توالی نوکلئوتیدی در شناسایی قارچ‌ها در علوم پزشکی، کشاورزی و صنعت به‌طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین از داده‌های توالی برای مطالعه روابط خویشاوندی بین موجودات زنده در سطوح تاکسونومیک مورد علاقه در زیست شناسی تکاملی استفاده می‌شود (۱۹و۱۵و۱۴و۹و۶).

با پیشرفت‌های اخیر در فناوری‌های توالی‌یابی که از سرعت و دقت عمل بیشتری برخوردار بوده و هزینه‌های توالی‌یابی را به صورت قابل توجهی کاهش داده‌اند، تعیین توالی نواحی ژنی و ژنوم موجودات زنده سرعت فزآینده‌ای به خود گرفته است. در این خصوص، قارچ‌ها جزو گروه‌های پیشرو به شمار می‌روند و توالی کامل ژنوم تعداد زیادی از گونه‌های قارچی بیماری‌زای انسانی، گیاهی و قارچ‌های مورد استفاده در صنعت (۲۵-۲۳) در دسترس می‌باشد. رهیافت پیروسکوئنسینگ یک فناوری جدید توالی‌یابی می‌باشد که برخلاف روش مبتنی بر پایان‌دهی زنجیره[2]، یک روش توالی‌یابی Real-Time است و از آزاد شدن نور به عنوان علامتی برای الحاق نوکلئوتید به رشته DNA هدف استفاده می‌کند. در این روش که در سال ۱۹۹۶ ابداع و معرفی گردید، الحاق نوکلئوتید مکمل در زنجیره در حال ستنز DNA منجر به آزاد شدن نور بر اساس یک سری فعل و انفعلات آنزیمی می‌شود (۲۶). با انباشته شدن داده‌های

3 - Biodegradation and bioremidiation

2- Chain terminator sequencing (Sanger sequencing)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

توالی نوکلئوتیدی ایده‌های جدید برای شناسایی موجودات زنده شکل گرفته و یا در حال شکل‌گیری می‌باشند و هدف نهایی دانشمندان، ایجاد فناوری لازم برای تشخیص سریع گونه‌های موجودات زنده با ضریب اطمینان بالا و با قابلیت اتوماتیک کردن می‌باشد. هبرت و همکاران در سال ۲۰۰۳ (۱) برای اولین بار یک روش جالب و جدیدی را برای شناسایی جانوران بر اساس تنوع ژنی سیتوکروم اکسیداز یک[1] پیشنهاد کردند. آنها ناحیه ۶۴۸ جفت بازی از این ژن را به خاطر نداشتن اینترون، نوترکیبی کمتر و شکل هاپلوئیدی وراثت ژن انتخاب کردند که این روش در مورد شناسایی حیوانات در ۹۵٪ موارد قابل قبول بود و ۵٪ باقیمانده مربوط به وجود گونه‌های جدید بود (۱۶و۱). در واقع رمزینه‌گذاری DNA برای اولین بار جهت شناسایی سریع و دقیق گونه‌های حیوانی ابداع شد که در آن ژنوم میتوکندریایی موش به عنوان مرجع استفاده قرار گرفته بود و هدف امروزی آن استفاده در شناسایی تمامی گونه‌های یوکاریوت می‌باشد. در حال حاضر از رمزینه‌گذاری DNA در شناسایی گروه‌هایی از قبیل پرندگان، ماهی‌ها، مورچه‌ها، بال پولک‌داران، جلبک‌های دریایی، دیاتوم‌ها و پروتوزوآها و گیاهان (۳۰-۲۷و۱) استفاده می‌شود. فعالیت در زمینه رمزینه‌گذاری DNA در مورد قارچ‌ها اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط محققان دانشگاه گلف کانادا صورت گرفت و در سال ۲۰۰۴ با شروع به کار کنسرسیوم رمزینه‌گذاری موجودات زنده[2] (حیات) یا CBOL پیشرفت‌های قابل توجهی در این زمینه صورت گرفت. سپس ابزارهای قوی شناسایی در مجموعه‌ای به نام کتابخانه‌ی مرجع رمزینه‌گذاری DNA[3] جمع‌آوری گردید (۳۱).

رمزینه‌گذاری DNA در قارچ‌ها

تعداد کل گونه‌های موجود قارچی ناشناخته است و بیشترین تخمین ذکر شده ۱/۵ میلیون گونه است. تاکنون حدود ۱۲۰۰۰۰-۸۰۰۰۰ گونه‌ی قارچی توصیف شده (۳۲) که این تعداد هر ساله به میزان ۱/۲ درصد افزایش می‌یابد و این به معنای توصیف ۱۷۰۰ گونه در هر سال است. استفاده از رمزینه‌گذاری DNA در طول ۲۰-۱۵ سال اخیر به بخش مهمی از تحقیقات اکولوژیکی تبدیل شده است و نگرش جدیدی را به تنوع زیستی و تفاوت‌های گروه‌های مختلف قارچی ایجاد کرده است (۱۶و۱). رمزینه‌گذاری DNA روشی برای شناسایی سریع، دقیق و قابل اتومات شدن گونه‌ها با استفاده از یک ناحیه ژنی کوتاه و استاندارد به عنوان نشانمند کردن بین گونه‌ای است که روشی عملی و قابل اطمینان بوده و نیاز به تخصص بالا ندارد. رمزینه‌گذاری DNA به عنوان ابزاری برای شناسایی دقیق گونه‌ها در مطالعات اکولوژیکی و تنوع بین گونه‌ای استفاده می‌شود (۱۶و۱). این روش، مکملی برای تشخیص لینه‌ای بوده که به تنهایی قادر به شناسایی گونه جدید نیست. اولین بار از ژن *COX1* به عنوان یک نشانگر رمزینه قارچی توسط سایفرت (۴و۱) در مورد قارچ‌ها استفاده شد و علت آن را سهولت رج‌بندی توالی *COX1* در بین دودمان‌های همه قارچ‌ها بر خلاف توالی ناحیه ITS-rDNA و *β-tubulin* و نیز مشترک بودن ژن *COX1* بین حیوانات و پروتیستا بیان کردند. اما امروزه انجمن قارچ شناسی بین المللی، ITS-rDNA را به جای *COX1* برای رمزینه‌گذاری به عنوان مرجع قرار داده و علت آن را مشکل بودن تکثیر *COX1*، حضور اینترون‌های متحرک چندگانه با طول‌های متفاوت، حضور نسخه‌های چندگانه از این ژن و عدم وضوح کامل COX1 در برخی آرایه‌ها بیان کرده است (۳۴و۲). اپرون RNA ریبوزومی بخش‌های مختلفی را شامل می‌شود که به صورت تکرارهای دوتایی و به تعداد نسخه‌های متعدد در ژنوم موجودات زنده وجود دارد. این ناحیه شامل زیر واحد کوچک (Small Subunit)، زیر واحد بزرگ (large subunit)، ITS، IGS و ۵S است. ساختار اپرون RNA ریبوزومی به این ترتیب است که به‌دنبال ناحیه زیر واحد

1 - Subunit 1 of cytochrome c oxydase
3 - www.barcoding.si.edu
4- Consortium for the Barcode of Life
5 - DNA Barcode Reference Library

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

کوچک (SSU) ناحیه ITS واقع شده است که دو بخش ITS1 و ITS2 را شامل می‌شود و ما بین این دو بخش ژن ۵/۸S واقع شده است. بعد از ناحیه ITS، ناحیه زیر واحد بزرگ (LSU) واقع شده است، به‌دنبال آن ناحیه IGS قرار دارد و اغلب از دو بخش IGS1 و IGS2 تشکیل شده است. در حد فاصل این دو بخش نیز در برخی گروه‌ها ناحیه ۵S قرار می‌گیرد (شکل ۱). آغازگرهای متعددی برای تکثیر این ناحیه در گروه‌های مختلف قارچی طراحی شده‌اند که از بین آنها می‌توان به ITS1/ITS4، V9G/ITS4، ITS5/ITS4 و ITS1/ITS4 اشاره کرد (۳۴و۲). ناحیه ITS با تعداد نسخه زیاد در داخل ژنوم، با تنوع مناسب بین گروه‌های مختلف قارچی و موجودات زنده دیگر و نیز نواحی حفاظت شده برای طراحی آغازگرها و دارای ژن‌های متنوع با سرعت تکاملی مختلف به عنوان مرجع و پایه رمزینه‌گذاری تلقی می‌شود. در حال حاضر بیش از یکصد هزار توالی ITS برای قارچ‌ها در پایگاه داده توالی نوکلئوتیدی بین‌المللی (GenBank) و سایر پایگاه‌های اطلاعاتی وجود دارد و در کل، استفاده از ناحیه ITS به عنوان متمم مناسب در شناسایی گونه‌های قارچی به شمار می‌رود (۳۴و۲). با این حال ناحیه ITS در تعداد معدودی از قارچ‌ها کارایی مناسبی ندارد و امکان شناسایی برخی از گروه‌های قارچی در سطح گونه بر اساس داده‌های ناحیه ITS وجود ندارد (۲). به عنوان مثال در گونه‌های ریز اسپور آلترناریا، گونه‌های سرکوسپورا و برخی گونه‌های فوزاریوم، ناحیه ITS-rDNA از تنوع کافی بین گونه‌های مختلف برخوردار نیست و استفاده از توالی نوکلئوتیدی این ناحیه تنها برای شناسایی در سطح جنس یا کمپلکس گونه‌ای مفید است و قادر به تفکیک در حد گونه نیست (۱۵و۲). در موارد معدودی توالی ناحیه ITS در داخل جمعیت‌های یک گونه قارچی از تنوع قابل توجهی برخوردار می‌باشد و در این صورت توالی این ناحیه کارآیی لازم را برای تفکیک گونه‌ها از یکدیگر داراست. به عنوان مثال در مورد جمعیت‌های گونه *Mycosphaerella musicola* عامل بیماری سیگاتوگای زرد موز، تنوع قابل توجهی در توالی ناحیه ITS بین جمعیت‌های مختلف وجود دارد (۸)، در حالی‌که با استفاده از توالی‌های ژن‌های دیگر کد کننده پروتئین تنها وجود یک گونه *M. musicola* در داخل این جمعیت‌ها حمایت می‌شود (۸). عقیده بر این است که پس از پدیده های گونه‌زایی اخیر، به خاطر تعداد زیاد نسخه اپرون RNA ریبوزومی، احتمال وجود تنوع ژنتیکی قابل توجه در ناحیه ITS بین جمعیت‌های مختلف یک گونه جدید وجود دارد که در طول زمان بر اساس پدیده تکامل هماهنگ[1] توالی نسخه‌های مختلف این ناحیه به صورت همگن در می‌آیند (۳۵).

زیر واحدهای کوچک و بزرگ اپرون RNA ریبوزومی (SSU و LSU) به دلیل سرعت کند تکاملی برای مطالعه سطوح بالاتر آرایه‌بندی[2] استفاده می‌شوند. این نواحی از مزیت‌های دیگر ذکر شده برای ناحیه ITS-rDNA (داشتن تعداد نسخه زیاد، امکان طراحی آغازگرهای عمومی و ....) برخوردار هستند. امروزه توجه قارچ‌شناسان به استفاده از داده‌های توالی LSU برای شناسایی جنس‌ها و تعیین حدود و ثغور جنس و سطوح بالاتر آرایه‌بندی معطوف شده است (۳۴و۲). در مواردی که داده‌های ITS از قدرت تفکیک موقعیت فیلوژنتیک برخی از گونه‌های ناشناخته و یا کمتر شناخته شده برخوردار نمی‌باشند، توصیه بر این است که ابتدا با استفاده از داده‌های توالی LSU و یا SSU جنس جدایه ناشناخته تعیین شود (۲).

بررسی‌های ژنومیکی و اطلاعات مولکولی باعث شده است تا به ژن‌های دیگر با تنوع بالا توجه بیشتری شود. به‌طور کلی ژن‌های هدف در مورد قارچ‌ها متنوع بوده و شامل LSU rDNA، SSU rDNA، ITS rDNA، *TEF-1α*، *RPB1*، *RPB2*، *β-tubulin*، *Acitn*، *Calmodulin* و *HistonH3* می‌شود (۳۴و۳و۲). به

1 - Concerted evolution
2 - Deep order Phylogeny

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

عنوان مثال در مورد گونه‌های *فوزاریوم*، فیلوژنی بر اساس توالی DNA ریبوزومی ناحیه‌ی ITS می‌تواند منجر به نتیجه‌گیری‌های غیر واقعی شود و از طرفی دیگر استفاده از *COX1* به علت وجود اینترون و چند نسخه‌ای بودن آن مشکل‌ساز بوده و در مقابل، ژن *TEF-1α* به عنوان یک ژن تک‌نسخه، چند شکلی مناسبی را بین گونه‌های نزدیک به‌هم در جنس فوزاریوم حتی در مقایسه با ژن‌های کد کننده پروتئین مثل *Calmodulin*، *β-tubulin* و *HistonH3* نشان می‌دهد (۱۵). در مورد گونه‌های *کلادوسپوریوم* که تاکنون بیش از ۸۰۰ گونه در این جنس شناسایی شده است، از توالی ژن *acitn* برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌شود (۲). در مورد شناسایی برخی از قارچ‌ها نیز ابزارهای خاصی طراحی شده است مثلا شناسایی گونه در مورد *Trichoderma* بر اساس آنالیز توالی ITS و *TEF-1α* با استفاده از ابزاری به نام TrichoKey یا TrichoBLAST صورت می‌گیرد. البته کارآیی این روش در مورد شناسایی قارچ‌های بیماری‌زای انسانی به مراتب بیشتر است (۳۶و ۳۵).

رمزینه‌گذاری DNA در قارچ‌های بیماری‌زای انسانی

تاکنون ۴۰۰ گونه قارچی به عنوان عامل بیماری‌زای حیوانی شناسایی شده است که از بین این گونه‌ها، تعدادی نیز عامل بیماری‌زای انسانی می‌باشند و از اهمیت بالایی برخوردار هستند (۲۲). در انسان شیوع بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها در مقایسه با بیماری‌های ویروسی و باکتریایی کمتر (۲۰تا۳۰٪) اتفاق می‌افتد. اما گاهی بیماری‌های قارچی به خصوص در افراد با نقص سیستم ایمنی علیرغم درمان‌های ضد قارچی منجر به آسیب‌های شدید و مرگبار (۶۰-۸۰٪) می‌گردد (۱۳-۱۱). با توجه به مرگ و میر بالای بیماری‌های قارچی تهاجمی، تشخیص سریع و به موقع و شناسایی عوامل ایجاد کننده به همراه درمان مؤثر می‌تواند درصد تلفات را کاهش دهد (۱۳-۱۱). در حال حاضر درمان عفونت‌های قارچی با استفاده از داروهای ضد قارچی با میزان نفوذپذیری بالا و اثرات سایتوتوکسیکی[1] کم صورت می‌گیرد. بنابراین با توجه به مزایای بیان شده در شناسایی سریع و دقیق عامل بیماری، روش رمزینه‌گذاری DNA کاربرد وسیعی در قارچ‌شناسی و میکروبیولوژی پزشکی دارد (۳۷).

از جمله بیماری‌های قارچی که روش رمزینه‌گذاری DNA در مورد آنها کاربرد دارد، می‌توان به عوامل کاندیدایی که جزء چهارمین عفونت‌های منتشره[2] بیمارستانی محسوب می‌شوند، اشاره کرد (۳۷). تاکنون بیش از ۲۰ گونه *Candida* شناخته شده که *C. albicans* از مهم‌ترین آنهاست و این گونه دارای فعالیت لیپازی برون‌سلولی و قابلیت تولید ریسه‌های غلبه کننده است و در دمای ۳۷°C به راحتی رشد می‌کند. جنس *Candida* به دلیل داشتن ویژگی‌های ریخت‌شناختی قابل تغییر، قابلیت تعویض فنوتیپ پرگنه به صورت مکرر، تنوع ژنتیکی بالا و واکنش با باکتری‌های مختلف در داخل بدن، توانایی آلوده‌سازی انسان را به‌دست آورده و باعث ایجاد بیماری می‌گردد. این قارچ در تمام سطح بدن انسان زندگی می‌کند و تحت شرایط خاصی باعث کاندیدیازیس[3] از فرم آرام تا منتشره در انسان می‌گردد. لازم به ذکر است که شناسایی گونه‌های این جنس بر اساس ناحیه‌ی ITS صورت می‌گیرد (۳۷).

یکی دیگر از عوامل قارچی مهم *Pneumocystis jroveciii* است که قادر است انسان و جانوران را آلوده نماید. این بیماری بیشتر در بیماران مبتلا به HIV مشاهده می‌شود. این قارچ در ابتدا به عنوان یک پروتوزئوآ تلقی می‌شد ولی نتایج تحقیقات بعدی بر اساس داده‌های مولکولی نشان داد که *Pneumocystis* متعلق به سلسله قارچ‌های حقیقی می‌باشد و امروزه شناسایی آن بر اساس روش‌های رمزینه‌گذاری صورت می‌گیرد (۳۸). از سایر عوامل قارچی می‌توان به جنس *Exophiala* اشاره کرد که دارای بیش از ۱۱ گونه است و بعضی از گونه‌های آن

1 - Cytotoxicity
2 - Systemic
3 - Candidiasis

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

سبب بیماری فئوهایفومایکوزیس[1] پوستی تا منتشره در انسان می‌گردند. گونه‌های متعلق به این جنس نیز با توالی‌یابی ناحیه ITS مورد شناسایی قرار می‌گیرند (۳۹). همان طوری‌که گفته شد برخی از اعضای مخمرهای سیاه نیز به عنوان عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب به شمار می‌روند و دارای پتانسیل ایجاد بیماری روی انسان و حیوانات هستند. بیماری‌های ایجادشده توسط اعضای این گروه شامل کروموبلاستومایکوزیس[2] (عفونت‌های جلدی و زیر جلدی)، عفونت و آبسه مغزی[3] تهدیدکننده حیات می‌باشند (۴۴-۴۰) این راسته از تنوع ریخت‌شناختی وسیعی برخوردار بوده و مطمئن‌ترین راه شناسایی آنها استفاده از ناحیه ITS می‌باشد. به طور کلی شناسایی گروه‌های قارچی بیماری‌زا در انسان با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی منجر به نتیجه‌گیری‌های غلط و غیر واقعی و در نتیجه درمان ناکارآمد می‌گردد و روش رمزینه‌گذاری DNA تا حدودی باعث مرتفع شدن این نارسایی‌ها شده است (۱۴و ۱۳و۱۱).

مراحل رمزینه‌گذاری DNA

اولین قدم برای رمزینه‌گذاری DNA ایجاد توالی رمزینه مرجع برای گونه‌های مختلف موجودات زنده می‌باشد. توالی‌های مرجع در یک کتابخانه جهانی و با قابلیت دسترسی عمومی قرار داده می‌شوند و بدین‌ترتیب از طریق مقایسه و جستجوی توالی رمزینه گونه ناشناخته در کتابخانه جهانی توالی رمزینه‌های مرجع، امکان شناسایی سریع گونه ناشناخته فراهم می‌شود. برای این منظور کنسرسیوم رمزینه‌گذاری موجودات زنده با موسسه و سازمان‌های دولتی و غیر دولتی در کشورهای مختلف همکاری می‌کند و در حال حاضر، این کنسرسیوم به صورت رسمی در حال اجرای پروژه‌های مشترک رمزینه‌گذاری DNA با ۵۰ کشور است. به‌طور کلی رمزینه‌گذاری سه بخش عمده را شامل می‌شود: ۱) جمع آوری، شناسایی و نگهداری نمونه‌های مرجع در مراکز معتبر: شناسایی صحیح و نگهداری نمونه‌هایی که بر اساس آنها توالی رمزینه مرجع ایجاد می‌شود، از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشد، زیرا شناسایی نادرست منجر به اختصاص برچسب نادرست به توالی رمزینه مرجع شده و شناسایی صحیح هویت جدایه‌های ناشناخته از طریق رمزینه‌گذاری DNA امکان‌پذیر نخواهد شد.

۲) استخراج DNA از نمونه‌ها، تکثیر توالی رمزینه و توالی یابی: امروزه با استفاده از کیت‌های تجاری، استخراج DNA با سرعت عمل بالا انجام می‌گیرد. تکثیر توالی رمزینه و توالی‌یابی با استفاده از روش‌های استاندارد به صورت روتین صورت می‌گیرد. ۳) مدیریت داده‌ها: در نهایت لازم است که توالی رمزینه DNA و اطلاعات مربوط به نمونه‌های مرجع در پایگاه‌های عمومی ارایه شود (۴۶و۴۵و۳۶).

مشکلات در رمزینه‌گذاری DNA

امروزه از توالی کوتاه رمزینه برای ترسیم درخت فیلوژنتیک استفاده می‌شود و اگرچه منعکس کننده روابط خویشاوندی مورد قبولی است، اما ممکن است برخی ملاک‌های آماری باعث ایجاد اختلال‌های درونی گردد. همچنین تخریب DNA در نمونه‌های آرشیوی و پردازش مواد زیستی اغلب مانع از حصول قطعات بزرگتر از ۲۰۰ جفت باز در روش PCR می‌گردد (۴۶و۴۵). از مشکلات دیگر رمزینه‌گذاری می‌توان به عدم استفاده از روش‌های فعلی برای تجزیه و تحلیل جامع نمونه‌های محیطی به علت تنوع بالای توالی اشاره کرد که مستلزم استفاده از مجموعه آغازگرهای مجزا برای هر یک از گروه‌های عمده طبقه بندی است. عدم وجود یک ژن عمومی یا ژن موجود در تمام دامنه‌های حیاتی از مشکلات دیگری است که برای مرتفع کردن آنها تلاش‌های زیادی صورت می‌گیرد (۴۶و۴۵و۳۴).

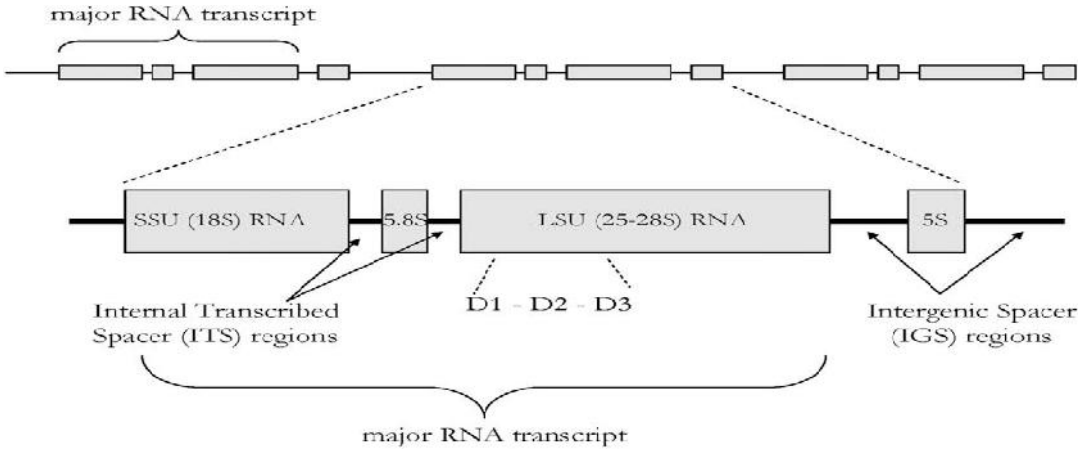
از طرف دیگر توالی‌های مفید ژنتیکی زیادی در بانک ژن وجود دارند، اما همه توالی‌های موجود اعتبار یکسانی

1 - Phaeohyphomycosis
2 - Chromoblastomycosis
3 - Brain or epidural abscess

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

ندارند. توالی‌های قدیمی که به‌صورت دستی ایجاد و ثبت می‌شدند نسبت به توالی‌های اخیر همان ژن کوتاه‌تر و دارای دقت کمتری هستند. تکثیر مکرر ژن ممکن است توام با خطاهایی باشد که به واسطه تفاوت در نوع Taq پلیمراز یا پروتکل توالی‌یابی به‌وجود می‌آیند. همچنین استفاده از توالی‌های مربوط به یک جدایه حاصل از کشت معتبر موجود معمولاً ارزش بیشتری از توالی‌های متفرقه دارند (۲).

در مورد جنس قارچی *Pheoacromonium* می‌توان از ترکیبی از خصوصیات مثل ویژگی‌های ریخت‌شناختی، اطلاعات DNA و خصوصیات فیزیولوژیکی در شناسایی گونه استفاده کرد (۴۸و ۴۷).



شکل ۱- سازماندهی ساختاری ژن‌های ریبوزومی در قارچ ها (LSU: Large subunit ،SSU: Small subunit)

نکات مورد توجه در رمزینه‌گذاری DNA

معمولا محققین در تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک، دنبال توالی‌های همگون یا همولوگ[1] یا مشابه هستند و مشابهت آنها نیز بر فرض انشقاق آنها از یک جد مشترک دلالت دارد و در مورد رمزینه‌گذاری DNA از ژن‌های آرتاساخت یا ارتولوگ[2] که این ژن‌ها از یک جد مشترک در نتیجه فرآیند گونه‌زایی منشا گرفته‌اند استفاده می‌شود ولی از ژن‌های پارالوگ[3] و زنولوگ[4] استفاده نمی‌شود. در رمزینه‌گذاری، دقت در انتخاب ژن و تعداد ژن بسیار مهم است مثلا از توالی SSU و LSU برای سطوح بالا که میزان جهش کمتر است، استفاده می‌شود. همچنین در رمزینه‌گذاری نیاز به تجزیه و تحلیل بر اساس چند ژنوم وجود دارد که عمدتاً از ژن‌های کد کننده پروتئین استفاده می‌شود، اما معمولا استفاده از ترکیبی از ژن‌های کد کننده و غیر کد کننده توصیه می‌شود. اصولا نواحی ژنی بایستی طوری انتخاب شوند که علاوه بر نشان دادن تنوع کافی، یک ناحیه حفاظت شده ژنومی بین گروه‌های مختلف را نیز شامل شود و درختچه فیلوژنتیک ترسیم شده باید به نوعی منعکس کننده درختچه فیلوژنتیک گونه (Species tree) باشد نه درختچه فیلوژنتیک ژن (Gene tree)، زیرا اگر درختچه بر مبنای یک ژن باشد در صورت پارالوگ و یا زنولوگ بودن آن ژن، برآورد درستی از مفهوم روابط فیلوژنتیکی امکان‌پذیر نخواهد بود.

بحث

با پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های نوین مولکولی و استفاده گسترده از این رهیافت‌ها در آرایه‌بندی قارچ‌ها و

1 -Homologous
2- Orthologus
3- Paralogous
4 -Xenologous

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

کارآیی داده‌های مولکولی در حل مشکلات تاکسونومیک قارچ‌ها و نارسایی‌های موجود در قوانین نامگذاری قارچ‌ها در دو سال اخیر مفهوم یک گونه قارچ = یک نام[1] از سوی برخی قارچ‌شناسان پیشنهاد شده است (۴۹و۴۸). متولیان این پیشنهاد معتقدند که با گذشت دو دهه از ابداع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و دسترسی به توالی نوکلئوتیدی موجودات زنده از جمله قارچ‌ها به نظر می‌رسد که اطلاق دو اسم جداگانه برای قارچ‌ها تحت عنوان تلئومورف[2] و آنامورف[3] چندان جالب نیست و با در اختیار داشتن توالی یک قارچ به راحتی جایگاه آرایه‌بندی آن مشخص می‌شود و نیازی به داشتن فرم جنسی آن برای تثبیت موقعیت آرایه‌بندی آن وجود ندارد. با این توصیف، احتمال جدا شدن سیستم نام‌گذاری قارچ‌ها از قوانین جهانی نام‌گذاری برای جلبک‌ها، قارچ‌ها و گیاهان (ICN[4]) و اختصاص یک قارچ‌رمزینه[5] برای کلیه قارچ‌ها در آینده وجود دارد (۵۰و۴۹). مشکلات و نارسایی‌های موجود در روش‌های مبتنی بر روش‌های سنتی از قبیل ریخت‌شناسی و ضرورت دقت و سرعت در آرایه‌بندی و تشخیص صحیح موجودات زنده، اهمیت رمزینه‌گذاری را در شناسایی قارچ‌های مختلف بیماریزای انسانی و گیاهی توسعه داده است. رمزینه‌گذاری DNA، صرفاً آرایه‌بندی نیست بلکه روشی با توان عملیاتی بالا، کارآمد و دقیق برای شناسایی دقیق گونه‌ها در همه شاخه‌ها است که بر اساس آن شناسایی و در نهایت شمارش تمام سازواره‌ها امکان‌پذیر می‌شود. بنابراین به‌طور کلی رمزینه‌گذاری DNA به شناسایی گونه‌ها با استفاده از داده‌های توالی یک یا تعداد بیشتری از ژن‌ها می‌پردازد. در واقع رمزینه‌گذاری DNA متمم آرایه‌بندی، فیلوژنی مولکولی و ژنتیک جمعیت است (۱۷و۱۶و۲و۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به رویکرد جدید "یک گونه قارچ=یک اسم" که در سال‌های اخیر در آرایه‌بندی قارچ‌ها مطرح شده است، به نظر می‌رسد مفهوم رمزینه‌گذاری DNA در قارچ‌ها اهمیت روزافزونی را خواهد داشت. نتایج تحقیقات انجام گرفته، کارآیی این رهیافت را در شناسایی سریع و مطمئن گروه‌های مختلف قارچی بدون نیاز به دانش تخصصی در زمینه خصوصیات ریخت‌شناختی قارچ‌ها به اثبات رسانده است. البته لازم به ذکر است که رمزینه‌گذاری DNA هنوز در مراحل ابتدایی تکوین خود بوده و نیاز فراوانی بر انجام مطالعات و تحقیقات گسترده در جهت نیل به این اهداف توصیه می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از داوران محترم این مقاله به خاطر ارایه نظرات ارزشمند ابراز می‌نمایند.

1 - One Fungus = One Name
2- Teleomorph
3- Anamorph
4 - International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants
5 - Mycocode

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

Reference

1. Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B 2003; 270: 313–321.
2. Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, Samson RA. Fungal biodiversity. CBS Laboratory Manual Series 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht; 2009. p. 269.
3. Arzanlou M. Phylogeny, detection and mating behavior of Mycosphaerella spp occurring on banana. PhD thesis. Wageningen University: the Netherlands; 2008.
4.Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, et al. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. Fungal Genet Biol 2000; 31: 21–32.
5. Taylor JW. Evolution of human-pathogenic fungi: Phylogenies and species. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP, editors. Molecular Principles of Fungal Pathogenesis. Washington DC: ASM Press; 2006; P. 113–132.
6. Arzanlou M, Abeln ECA, Kema GHJ, Waalwijk C, Carlier J, Vries I de, et al. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex of banana. Phytopathology 2007; 97:1112–1118.
7. Arzanlou M, Groenewald JZ, Gams W, Braun U, Shin HD, Crous PW. Phylogenetic and morphotaxonomic revision of Ramichloridium and allied genera. Stud Mycol 2007; 58:57–93.
8.Arzanlou M, Groenewald JZ, Fullerton RA, Abeln ECA, Carlier J, Zapater M-F, et al. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of mycosphaerella and related anamorphs on banana. Persoonia 2008; 20:19–37.
9. Arzanlou M, Kema GHJ, Waalwijk C, Carlier J, Vries I de, Guzmán M, et al. Molecular diagnostics for the Sigatoka disease complex and Radopholus similis in banana. Acta Hortic 2009; 828: 237–234.
10. Arzanlou M.Taxonomic and phylogenetic position of Ramichloridium mackenziei, causal agent of cerebral abscission in human. Journal of Ardabil University of Medical Sciences and Health Services 2011; 10: 95–05.
11. Badali H, Gueidan C, Najafzadeh MJ, Bonifaz A, Gerrits van den Ende AHG, de Hoog GS, et al. Biodiversity of the genus Cladophialophora. Stud Mycol 2008; 61: 175–191.
12. Badali H, Carvalho VO, Vicente V, Attili-Angelis D, Kwiatkowski IB, Gerrits Van Den Ende AH, et al. Cladophialophora saturnica sp. nov. a new opportunistic species of chaetothyriales revealed using molecular data. Med Mycol 2009; 47: 51–62.
17.Badali H, Bonifaz A, Barrón-Tapia T, Vázquez-González D, Estrada-Aguilar L, Oliveira NM, et al. Rhinocladiella aquaspersa proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. Med Mycol 2010; 48: 696–703.
14. Nancy L, Wengenack MJ, Binnicker. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med 2009; 30: 391–408.
15.Davari M, van Diepeningen AD, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Najafzadeh MJ, van der Lee TA, et al. Rapid identification of Fusarium graminearum species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). J Microbiol Methods 2012; 89: 63–70.
16. Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. Infect Genet Evol 2008; 8: 727 –736.
17. Costa FO, Carvalho GR. New insights into molecular evolution: prospects from the Barcode of Life Initiative (BOLI). Theory Biosci 2010; 129:149–157.
18. Termorshuizen AJ, Arnolds EJ M. On the nomenclature of the European species of the Armillaria mellea group. Mycotaxon 1997; 30: 101–106.
19. Arver, BA, Ward TJ, GaleLR, Broz KL, Kistler HC, Aoki T, et al. Novel fusarium head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. Fungal Genet Biol 2011; 48:1077–1152.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

20. Gadd GM. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. Mycol Res 2008; 111: 3–49.
21. Davari M, Arzanlou M, Babai Ahari A. Identification of some fungi involved in biodegradation of petroleum pollutants in Northwest of Iran. Rostaniha 2011; 12:1–12.
22. Badali H, Prenafeta-Boldu FX, Guarro J, Klaassen CH, Meis JF, de Hoog G S. Cladophialophora psammophila, a novel species of Chaetothyriales with a potential use in the bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. Fungal Biology 2011; 115:1019–29.
23. Desjardins C, Champion M, Holder J, Muszewsha A, Goldberg J, Baptista AJ, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. PlosGenet 2011; 7: e1002345.
24. Xu JR, Peng YL, Dickman MB, Sharon A. The dawn of fungal pathogen genomics. Annu Rev Phytopathol 2006; 44: 337–66.
25. Andersen MR, Salazaar MP, Schaap PJ, van de Vondervoort PJI, Culley P. Comparative genomics of citric-acid-producing Aspergillus niger ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. Genome Res 2011; 21: 885–897.
26. Elahi E, Ronaghi M. Pyrosequencing: a tool for DNA sequencing analysis. Methods Mol Biol 2004; 255: 211–219.
27. Smith MA, Fisher BL, Hebert PDN. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. Phil Trans R Soc London Series B 2005; 360: 1825–1834.
28. Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN. DNA barcodes distinguish species of tropical lepidoptera. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103: 968–971.
29. Evans KM, Wortley AH, Mann DG. An assessment of potential diatom ‘‘barcode’’ genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). Protist 2007; 158:349–364.
30. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. Phil Trans R Soc London B S 2005; 360: 1889–1895.
31. Nilsson RH, Kristiansson E, Ryberg M, Hallenberg N. Intraspecific ITS variability in the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evol Bioinf 2008; 4: 193–201.
32. Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. Stud Mycol 2004; 50:9–18.
33. Hajibabei MHM, Shoakralla S, Zhou X, Singer GAC, Baird DJ. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. PLoS One 2011; 6:e17497.
34. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc Natl Acad Sci USA 2012; 109: 6241–6246.
35. Rooney AP, Ward TJ. Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102; 14: 5084–5089.
36. Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Komoń M, Bissett J, Szakacs G, Kubicek CP. An oligonucleotide barcode for species identification in Trichoderma and Hypocrea. Fungal Genet Biol 2005; 42: 813–828.
37. Serena C, Firacative C, van de Wiele N, Arabatzis M, Robert V, Fanrong K, et al. Internal transcribed spacer (ITS) sequence database as DNA barcoding resource for the identification

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]

of human pathogenic fungi. Available at:http://www.dnabarcodes2011.org/documents/presentations/12-2/taxsessionsa/fungi1/1100-Firacative.pdf. Accessed on 25/2/2013.
38. Chabé M, Herbreteau V, Hugot JP, Bouzard N, Deruyter L, Morand S, et al. Pneumocystis carinii and pneumocystis wakefieldiae in wild Rattus norvegicus trapped in Thailand. J Eukaryot Microbiol 2010; 57:213–217.
39. Morio F, Le Berre J-Y, Garcia-Hermoso D, Najafzadeh MJ, de Hoog S. Phaeohyphomycosis due to exophiala xenobiotica as a cause of fungal arthritis in an HIV-infected patient. Med Mycol 2012; 50: 513–517.
40- Badali H, de Hoog GS, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis. Use of amplified fragment length polymorphism to identify 42 cladophialophora strains related to cerebral phaeohyphomycosis with in vitro antifungal susceptibility. J Clin Microbiol 2010; 48:2350–2356.
41- Badali H, Chander J, Seyedmousavi S, Sidhu S, Rani H, Attri A, et al. Multiple subcutaneous cysts due to exophiala spinifera in an immunocompetent patient. Med Mycol 2012;50:207–13.
42- Badali H, Hedayati MT, Bahoosh M, Kasiri A, Ghasemi M, Motahari J, et al. Exophiala oligosperma involved in a refractory chronic rhinosinusitis. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2011;15: 319–23.
43- Badali H, Chander J, Gupta A, Rani H, Punia RS, De Hoog GS, et al. Fatal cerebral phaeohyphomycosis in an immunocompetent individual due to Thielavia subthermophila: Case report and review of the literature. J Clin Microbiol 2011;49:2336–41.
44- Badali H, Chander J, Gulati N, Attri A, Chopra R, Najafzadeh MJ, et al. Subcutaneous phaeohyphomycotic cyst caused by pyrenochaeta romeroi. Med Mycol 2010; 48: 763–8.
45. Kang S, Mansfield MA, Park B, Geiser DM, Ivors K L, . The promise and pitfalls of sequence-based identification of plant-pathogenic fungi and oomycetes. Phytopathology 2010; 100:732–737.
46.Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, Maier W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. Appl Microbiol Biotech 2010; 87: 99–108.
47. Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W, Crous PW. Taxonomy and pathology of togninia (diaporthales) and its phaeoacremonium anamorphs. Stud Mycol 2006; 54: 1–115.
48. Hawksworth DL. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. Myco Keys 2011;1: 7–20.
49. Taylor JW. One Fungus One Name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR. IMA Fungus 2011; 2: 113–120.
50. Shenoy BD, Jeewon R and Hyde KD. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. Fung Divers 2007; 26: 1–54.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-11]