رستنیها، جلد ۹(۱)، ۱۳۸۷

مایه‌زنی متقابل دو ژنوتیپ فسکیوی بلند با قارچ اندوفیت جنس *Neotyphodium* و ردیابی آن‌ها با نشانگر AFLP*

Cross inoculation of two tall fescue genotypes with *Neotyphodium* endophytic fungus and its detection using AFLP marker

اسماعیل شهسواری، آقافخر میرلوحی، بهرام شریف‌نبی و مجتبی خیام‌نکویی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

دریافت: ۱۳۸۶/۸/۲۲ پذیرش: ۱۳۸۷/۴/۱

چکیده

رابطه همزیستی بین گراس‌ها و قارچ‌های اندوفیت یکی از مهمترین همزیستی‌ها در طبیعت می‌باشد. قارچ‌های جنس *Neotyphodium* عضو تیره Clavicipitaceae هستند که با گراس‌های زیرتیره Pooideae همزیست می‌باشند. در این پژوهش، دو ژنوتیپ گیاهی انتخاب و قارچ‌های اندوفیت همزیست از آن‌ها استخراج گردید. وجود قارچ‌های اندوفیت در میزبان‌های تلقیح شده با روش‌های میکروسکوپی، نشانگر مولکولی AFLP و اجرای اصول کخ بررسی شدند. در این تحقیق روش گزارش شده *لچ* و *کریستنسن* با موفقیت همراه بود و تنها از طریق این روش، قارچ‌های اندوفیت گرفته شده از یک ژنوتیپ با موفقیت وارد همان ژنوتیپ و دیگر ژنوتیپ‌ها شدند. این بررسی مشخص نمود برای تشخیص وجود قارچ در میزبان‌های گیاهی

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر آقافخر میرلوحی و دکتر مجتبی خیام‌نکویی ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

* مسئول مکاتبه (E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir)

مایه‌زنی شده، روش‌های میکروسکوپی مناسب می‌باشد. نشانگر AFLP وجود قارچ در بعضی از گیاهان مایه‌زنی شده به طور مصنوعی را تایید کرد. در حالی‌که در مورد بعضی دیگر از گیاهان مایه‌زنی شده وجود قارچ با این نشانگر تایید نشد. استفاده از اصول کخ نشان دادکه قارچ‌های اندوفیت در میزبان‌های جدید از لحاظ مورفولوژی و ظاهر تغییر نمی‌کنند.

واژه‌های کلیدی: همزیستی، Clavicipitaceae، AFLP، *Festuca*، تلقیح متقابل

مقدمه

در سالهای اخیر رابطه همزیستی قارچ‌های اندوفیت با گراس‌های سردسیری توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است. این قارچ‌ها باعث بیماری در دام‌هایی می‌شوند که از گراس‌های آلوده به آن‌ها تغذیه نموده و علایمی مانند کاهش وزن حیوان، زبر شدن موها، کاهش شیر و نکروزه شدن سم حیوان را به دنبال دارند (Bacon *et al.* 1997, Schardl 2001). در پی یافتن علت بیماری در حیوانات، وجود قارچ در گیاه مشخص و تحقیقات بعدی نشان داد که این قارچ‌ها از جنس *Neotyphodium* و تیره Clavicipitaceae می‌باشند که با گراس‌های زیرتیره Pooideae به طور سیستمیک همزیست هستند. حضور قارچ‌های اندوفیت در گیاه مزایای زیادی برای گیاه میزبان به همراه دارد که از جمله باعث مقاومت به تنش‌های محیطی شامل خشکی، سرما، تغییرات pH و یون‌های سمی در خاک می‌شوند (Dehghanpour *et al.* 2006, Malinowski & Belesky 2000, Mirlohi *et al.* 2004 و Parsaeian *et al.* 2007). همچنین از طریق تولید آلکالویید باعث ایجاد مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی شامل بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و حشرات می‌گردند (Sabzalian *et al.* 2004). از طرفی، تولید آلکالوییدها توسط این قارچ باعث ایجاد برخی مسمومیت‌ها در دام‌های تغذیه‌کننده از گیاهان حاوی قارچ می‌شود. لذا، تحقیقاتی به منظور حفظ خصوصیت‌های مطلوب ذکر شده و در عین حال کاهش مسمومیت ناشی از این قارچ در دام‌های تغذیه کننده انجام شده است (Bouton *et al.* 2002, Ganjali *et al.* 2004, Dehghanpour *et al*. 2006, Parsaeian *et al.* 2007).

از آنجا که انتقال این قارچ از یک نسل میزبان به نسل بعد به صورت عمودی صورت می‌گیرد، قارچ در اندام هوایی گیاه استقرار یافته و از طریق رویش در تخمدان وارد بذر شده در لایه آلرون باقی می‌ماند و مجددا با جوانه‌زنی بذر وارد گیاه می‌شود (Bacon *et al.* 1997, Burns *et al*. 2006, Christensen *et al.* 1997, Ganjali *et al.* 2004, Mirlohi *et al.* 2004 و Schardl 2001) که در این صورت امکان انتقال قارچ‌های اندوفیت به میزبان جدید به آسانی وجود ندارد. لذا، مایه‌زنی مصنوعی برای این قارچ به معنی وارد کردن

آن به طور مصنوعی و آزمایشگاهی به داخل گراس‌ها می‌باشد. در صورتی‌که نمونه‌ای از قارچ با سمیت کم و یا بدون سمیت برای دام‌های تغذیه کننده در دست باشد. با این روش می‌توان ترکیب مناسبی از قارچ و گیاه به دست آورد که علاوه بر این که برای دام‌ها سمی نباشد خصوصیات خوب این همزیستی را دارا باشد.

لچ و کریستنسن (Latch & Christensen 1985) روشی را برای مایه‌زنی مصنوعی ارایه کردند و از این طریق پنج گونه از اندوفیت‌ها را از گراس‌های مختلف جدا کرده و با استفاده از تکنیک قرار دادن اندوفیت در بافت کلئوپتیل در محیط کشت آب- آگار، این قارچ‌ها را به ارقام فسکیوی بلند و لولیوم مایه‌زنی نمودند.

کیرنی و همکاران (Kearney *et al.* 1991) از روش کشت بافت برای مایه‌زنی مصنوعی فسکیوی بلند استفاده کردند. درصد موفقیت در این روش حدود هشت درصد بود که نسبت به روش *لچ و کریستنسن* (۱۹۸۵) که حدود ۱۱ درصد می‌باشد، کمتر است.

جانسون- سیکالس و همکاران (Johnson-Cicalese *et al.* 2000) با استفاده از روش دیگری توانستند مایه‌زنی متقابل قارچ‌های اندوفیت را به گیاهان بالغ *Festuca rubra* subsp. *rubra* و *F. rubra* subsp. *fallax* انجام دهند. آن‌ها گیاهان را به صورت تک‌پنجه جدا کردند و پهنک برگ‌ها را به طول حدود سه سانتی‌متر کوتاه کرده و سپس با استفاده از سرنگ شیاری دو میلی‌متری در طوقه ایجاد و یک قطعه کوچک از میسلیوم قارچ اندوفیت همزیست رشد یافته روی محیط کشت را در داخل شیار قرار دادند. در این اقدام ۱۱ درصد گیاهان به قارچ آلوده شدند.

از کاربردهای مایه‌زنی متقابل می‌توان به تحقیق *بوتون* و همکاران (Bouton *et al.* 2002) اشاره کرد. ایشان در مطالعه خود دو نژاد اندوفیت تحت نام‌های AR542 و AR502 را که آلکالوییدهای ارگوت را به میزان کم تولید کردند، وارد رقم فسکیوی بلند Georgia-۵ نمودند. این رقم در همزیستی با این دو نژاد اندوفیت آلکالوییدکمی تولید می‌کند و از خصوصیات زراعی بهتر و مقاومت بیشتری نسبت به تنش‌ها، آفات و بیماری‌ها در مقایسه با کلون‌های عاری از قارچ برخوردار است. همچنین محققان با استفاده از مایه‌زنی مصنوعی به روش *لچ و کریستینسن* در فسکیوی بلند و ری‌گراس‌های (*Lolium* spp.) چندساله توسط جدایه‌ای از *N. coenophialum* (Morgan-Jones & Gams) Glenn, Bacon & Hanlin، گیاهان مقاوم به آفات کرم ساقه‌خوار بلوگراس (*Poa* spp.) را به دست آورند (Bouton *et al.* 2002). با این که در ظاهر مایه‌زنی مصنوعی اندوفیت‌ها امکان‌پذیر است ولی مشکلات فراوانی نیز در این امر وجود دارد. مساله ناسازگاری قارچ با گیاه به این معنی که قارچ پس از مایه‌زنی به گیاه مورد نظر (ژنوتیپ خاص) قادر به ادامه حیات نمی‌باشد، یکی از محدودیت‌های مهم این فرایند می‌باشد. بر اساس مطالعات محدود انجام گرفته به نظر می‌رسد

این رابطه ژنتیکی است و احتمالا چند ژن با وراثت‌پذیری نسبتا زیاد باعث سازگاری یا ناسازگاری گیاهان تلقیح شده با قارچ‌های اندوفیت باشد (Easton *et al.* 2002).

با توجه به این که قارچ‌های اندوفیت اثر متقابل با گیاه میزبان خود دارند و ترکیب مناسبی از قارچ و گیاه همواره مدنظر محققان بوده است و با توجه به کم بودن اطلاعات در خصوص قابلیت انتقال قارچ‌های اندوفیت بین میزبان‌های مختلف گیاه فسکیوی بلند ایرانی و همچنین تنوع چشمگیر این گیاه در ایران بهینه‌سازی روش‌های مایه‌زنی مصنوعی و تعیین سازگاری یا ناسازگاری حایز اهمیت است. همچنین شناسایی روش مناسب در انتقال قارچ‌های اندوفیت به گیاهان سازگار به محققان ایرانی اجازه می‌دهد تا قارچ‌های با خصوصیات برتر را به میزبان‌هایی با ژنوتیپ برتر انتقال دهند و لاین‌های مطلوب‌تر از نظر زراعی سازگار با شرایط ایران تولید نمایند.

هدف این پژوهش، بررسی و بهینه سازی روش‌های مایه‌زنی مصنوعی و تعیین بهترین روش انتقال سریع قارچ همزیست از یک ژنوتیپ گیاهی به ژنوتیپ‌های دیگر و بررسی اثر متقابل قارچ با گیاه میزبان بود.

روش بررسی

- مواد گیاهی

در این مطالعه از دو ژنوتیپ فسکیوی بلند *Festuca arundinacea* Schreb. (۲n=۶x=۴۲) باشماره‌های ۷۵ و ۸۳ استفاده گردید. این دو ژنوتیپ به صورت تک گیاه از دو توده گیاه مادری که به ترتیب از روستای کامیاران در استان کردستان و از روستای فریمان در استان خراسان جمع‌آوری شده بودند انتخاب و به صورت رویشی در گلخانه تکثیر گردیدند.

برای تولید گیاهان حاوی اندوفیت و بدون اندوفیت، از یک ژنوتیپ گیاهی یکسان پنجه‌های تکثیر شده هر ژنوتیپ به دو قسمت تقسیم گردیدند و سپس یک قسمت از هر ژنوتیپ توسط مخلوط دو قارچ‌کش پروپیکونازول (دو گرم ماده موثره در لیتر) و فولیکور (یک میلی‌لیتر در لیتر) تیمار شدند (Siegel *et al.* 1984). تیمار پنجه‌ها دو بار در هفته و به مدت دو هفته در حد خیس کردن برگ‌ها و غلاف برگ‌ها توسط مخلوط دو قارچ‌کش بود. دو هفته پس از آخرین سمپاشی، گیاهان مورد تیمار برای تعیین حضور اندوفیت به روش میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که اندوفیت به طور کامل از گیاهان تیمار شده فسکیوی بلند، حذف گردیده است. برای تکثیر بیشتر گیاهان عاری و حاوی اندوفیت در هر ژنوتیپ پنجه‌های رویشی برای یک دوره شش ماهه به کرت‌های مجزای کنار هم به مزرعه منتقل گردیدند. پس از این دوره تعداد کافی گیاهان عاری و حاوی اندوفیت از هر ژنوتیپ برای آزمایش‌های بعدی فراهم آمد. برای به دست آوردن بذر حاوی اندوفیت و بدون

اندوفیت از هر ژنوتیپ در زمستان سال ۱۳۸۱، گیاهان حاوی اندوفیت و بدون اندوفیت هر ژنوتیپ به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح بلوک تصادفی در سه تکرار در مزرعه کشت گردیدند. پلات‌ها با ابعاد ۱/۵ × ۱/۵ متر بود به طوری که در هر پلات، شش بوته (هر بوته حاوی پنج پنجه) کشت گردید. پس از استقرار گیاهان و شروع سیکل زایشی، با توجه به خود ناسازگاری این گیاه، پایه‌های مادری ژنوتیپ‌های ۸۳ و ۷۵ به ترتیب به وسیله ژنوتیپ ۷۵ و ۸۳ گرده افشانی شدند و بذور در مرحله رسیدگی دانه برداشت و در یخچال چهار درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمایش های بعدی نگهداری شدند. قابل ذکر است که این قارچ به صورت عمودی از پایه مادری وارد کیسه جنینی شده و پس از گرده افشانی و تشکیل بذر در لایه آلرون بذر مستقر می‌گردد، لذا بذور به دست آمده در این آزمایش نیمه‌خواهری به حساب می‌آیند.

- جداسازی قارچ‌ها

به منظور جداسازی قارچ‌های اندوفیت از گیاه میزبان نمونه‌هایی از غلاف برگ به ابعاد دو سانتی‌متر از کلون‌های گیاهی بریده شد و در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس درمحلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱۵ ثانیه ضدعفونی شدند. نمونه‌ها سه بار با آب سترون شسته شدند و روی کاغذ صافی سترون قرار گرفته تا آب اضافی آن‌ها خارج شود و سپس روی محیط کشت PDA قرار داده شدند (Ganjali *et al*. 2004).

برای مشاهده قارچ‌های اندوفیت در میزبان جدید از روش میکروسکوپی مبتنی بر رنگ‌آمیزی با ماده رنگی رزبنگال استفاده گردید (Belanger 1996).

- روش‌های مایه‌زنی قارچ

برای مایه‌زنی قارچ‌های اندوفیت به گیاهان فسکیوی بلند از سه روش مختلف که دو روش آن‌ها تحت شرایط سترون و یک روش دیگر تحت شرایط غیرسترون انجام گرفت استفاده شد:

روش اول: این روش مبتنی بر گزارش *لچ و کریستنسن* (۱۹۸۵) بود که در آن ابتدا بذور عاری از قارچ توسط هیپوکلریت سدیم ۲۵ درصد به مدت ۵۰-۳۰ دقیقه ضد عفونی و روی آب- آگار ۱/۵ درصد قرار داده شدند. بذور در دمای ۲۴-۲۰ درجه سانتی‌گراد در تاریکی مطلق نگهداری شدند و بعد از جوانه‌زنی با اسکالپل روی کلئوپتیل آن‌ها (کمی بالاتر از محل اتصال کلئوپتیل به مزوکوتیل) شکاف عمودی زده و مقداری کمی میسلیوم در داخل شکاف قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۹-۷ روز در تاریکی و سه روز در روشنایی قرار داده شدند و سپس به داخل گلدان‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر منتقل و روی آن‌ها با پلاستیک شفاف پوشانده شد. پس از سه روز پلاستیک‌ها برداشته و گیاهچه‌ها به گلخانه در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند. بعد از ۱۲-۱۰ هفته و ایجاد پنجه جدید وجود یا عدم وجود قارچ با استفاده از روش

بلنگر (۱۹۹۶) بررسی گردید. کلیه حالت‌های مایه‌زنی شامل مایه‌زنی قارچ‌های اندوفیت از یک میزبان به خودش (همسان) و مایه‌زنی متقابل صورت گرفت.

برای بررسی اثر سن گیاهچه بر موفقیت مایه‌زنی، مدت زمان ضدعفونی و کشت بذور روی آب- آگار تا زمان مایه‌زنی متقابل مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور از یک طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار استفاده و داخل هر تکرار ۳۰ گیاهچه مایه‌زنی گردید. تیمارها برای ژنوتیپ گیاهی ۸۳ که با جدایه ۷۵ مایه‌زنی شدند ۷، ۱۰ و ۱۴ روز و برای ژنوتیپ گیاهی ۷۵ که با جدایه ۸۳ مایه‌زنی شدند ۸، ۱۲ و ۱۵ روز بود. گیاهان حاوی قارچ (مایه‌زنی موفق) هر ژنوتیپ در هر سه تیمار شمارش شد. به منظور بررسی اثر تیمار تعداد روز از کشت بذر تا مایه‌زنی (سن گیاهچه) در مایه‌زنی متقابل دو ژنوتیپ گیاهی، چون داده ها شمارشی بودند تبدیل داده بر اساس رابطه انجام گرفت. برای داده‌هایی که مقدار آن‌ها صفر بود عدد ۰/۵ قرار داده شد و سپس تبدیل داده انجام و تجزیه واریانس با نرم افزار SAS(V6.12) انجام شد.

روش دوم: این روش بر اساس قرار دادن میسلیوم قارچ داخل بذر بود. در اینجا بذور هر دو ژنوتیپ داخل تشتک‌های پتری که حاوی کاغذ صافی سترون بودند، قرار داده شد و ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر یک اضافه گردید. درپوش‌های تشتک‌های پتری با پارافیلم پوشانده شدند و در شرایط نوری کامل و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این روش پنج الی هفت روز بعد از جوانه‌زنی تحت شرایط سترون پوسته بذور برداشته شد و با استفاده از بینوکولر، میسلیوم قارچ توسط سوزن حشره‌شناسی داخل آندوسپرم گیاه قرار داده شد. به منظور پوشاندن سطح بذر و جلوگیری از آلودگی بذور به قارچ‌های گندرو از نشاسته که در آب سترون به حد اشباع رسیده بود استفاده گردید. به این ترتیب که بذور بعد از مایه‌زنی به مدت ۲۰ ثانیه داخل محلول مذکور قرار گرفتند و به تشتک‌های پتری سترون انتقال داده شدند. این بذور به مدت پنج روز در تاریکی و سه روز در روشنایی زیر لامپ فلورسنت قرار داده شدند و بقیه مراحل مانند روش اول بود.

روش سوم: این روش مبتنی بر گزارش *جانسون- سیکالس* و همکاران (۲۰۰۰) بود. در این روش پس از این که کلون‌های عاری از قارچ دو ژنوتیپ گیاهی به اندازه کافی در گلخانه رشد کرده و قوی شدند از گلدان خارج شده و ریشه آن‌ها را زیر آب سرد گرفته تا خاک اطراف آن‌ها شسته شود. سپس این گیاهان که حاوی ۱۰ الی ۱۵ پنجه بودند به صورت یک یا دو پنجه‌ای جدا گردیدند. برگ‌های اضافی بریده شد و حدود سه سانتی‌متر از پهنک برگ حفظ شد. سپس به وسیله اسکالپل یک شکاف عمودی دو الی سه میلی‌متری در طوقه گیاه ایجاد و میسلیوم قارچ درون شکاف حاصله قرار داده شد. سریعا گیاهان مایه‌زنی شده به گلدان‌های حاوی خاک سترون انتقال داده شدند و بعد از رشد مجدد (۴۵ روز بعد از مایه‌زنی) برای بررسی وجود یا عدم وجود قارچ از روش رنگ آمیزی و مشاهده میکروسکوپی استفاده گردید. در اینجا

مایه‌زنی همسان شامل ۶۵ پنجه از گیاهان ژنوتیپ ۷۵ و ۸۱ پنجه از گیاهان ژنوتیپ ۸۳ بود که به ترتیب توسط قارچ جدایه ۷۵ و قارچ جدایه ۸۳ مایه‌زنی گردیدند و مایه‌زنی متقابل شامل ۱۶۷ پنجه از گیاهان ژنوتیپ ۷۵ و ۱۹۰ پنجه از گیاهان ژنوتیپ ۸۳ بود که به ترتیب توسط قارچ جدایه ۸۳ و قارچ جدایه ۷۵ مایه‌زنی گردیدند.

- ردیابی قارچ‌های اندوفیت در میزبان جدید

برای ردیابی قارچ اندوفیت مایه‌زنی شده در میزبان‌های جدید و تایید صحت تلقیح متقابل از سه روش میکروسکوپی، استفاده از نشانگر مولکولی AFLP و اصول کخ استفاده شد.

- روش AFLP: استفاده از نشانگر AFLP مبتنی بر وجود باندهای اختصاصی چند شکل برای هر یک از جدایه‌های قارچی و ژنوتیپ‌های گیاهی که امکان تمایز را فراهم می‌نمود صورت گرفت. وجود یا عدم وجود باندهای اختصاصی مبین حضور یا عدم حضور قارچ مربوط به حساب آمد. بدین منظور از جدایه‌های قارچی ۷۵ و۸۳، ژنوتیپ‌های گیاهی ۷۵ و۸۳ که به طور طبیعی حاوی اندوفیت بودند، ژنوتیپ‌های گیاهی ۷۵ و۸۳ که عاری از قارچ اندوفیت شده بودند و گیاهانی که به طور مصنوعی با جدایه های قارچی ۷۵ و۸۳ مایه‌زنی متقابل شده بودند DNA استخراج گردید. استخراج DNA گیاهی طبق روش چن و همکاران (Chen *et al.* 1999) انجام گرفت.

روش AFLP، بر اساس *ووس* و همکاران (Vos *et al.* 1995) با اندکی تغییر اجرا گردید. در این تحقیق از ترکیب دو آنزیم *Eco*RI و *Mse*I که از شرکت Roche آلمان تهیه شده بودند استفاده شد. در مرحله تکثیر پیش انتخابی از آغازگرهای بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ مانند آغازگر (5'GACTGCGTAGGTGCAG3') *Eco*RI و آغازگر (5'GATGAGTCCTGAGTAA3') *Mse*I استفاده گردید. در مرحله تکثیر انتخابی از آغازگرهای *Eco*RI / TC - *Mse*I / AC و *Eco*RI / TG - *Mse*I / TA با دو نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ استفاده شد.

برنامه PCR برای تکثیر پیش انتخابی شامل واسرشته سازی اولیه یک چرخه‌ای به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و واسرشت‌سازی به مدت یک دقیقه و در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بود. بعد از این مرحله ۲۶ چرخه ۵۴ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه‌ای برای اتصال و برای بست یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود و قسمت آخر (بسط نهایی) شامل یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه بود.

برای مرحله تکثیر انتخابی ابتدا محصول تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۱:۵ رقیق شد. برنامه PCR برای این مرحله شامل سه قسمت به شرح ذیل می‌باشد:

قسمت اول (واسرشت اولیه) شامل یک چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه).

قسمت دوم شامل ۱۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاهش می یابد.
قسمت سوم شامل ۲۳ چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه)، قسمت آخر (بسط نهایی) شامل یک چرخه ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه).

علاوه بر نشانگر AFLP از اصول کخ بدین مفهوم که بتوان از گیاهانی که به طور مصنوعی توسط قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شده بودند، مجددا همان قارچ را استخراج کرد استفاده گردید. برای این منظور از غلاف برگ گیاهان مایه‌زنی شده برای استخراج قارچ روی محیط PDA استفاده گردید. مدت زمان خروج قارچ و شکل ظاهری و خصوصیات قارچ‌های اندوفیت که از گیاهان مایه‌زنی شده به دست آمد با نمونه‌های قارچی اولیه مقایسه شدند.

نتیجه و بحث

- جداسازی قارچ‌های اندوفیت

مدت زمان خروج قارچ از بذر و غلاف در تشتک‌های پتری حاوی PDA بسته به ژنوتیپ گیاه و قارچ متفاوت بود. زمان خروج قارچ از بذر در ژنوتیپ ۷۵، ۳۵ روز و از غلاف ۲۵ روز بوده است و در ژنوتیپ ۸۳ این زمان از بذر ۴۵ روز (یعنی ۱۰ روز بیشتر) و از غلاف ۳۰ روز (یعنی پنج روز بیشتر) بوده است. این امر می‌تواند به علت تراکم بیشتر میسلیوم‌های قارچ در بذر و غلاف این ژنوتیپ باشد که نیاز به بررسی‌های دقیق تر دارد.

از طرفی درکشت غلاف‌های برگ، میزان آلودگی باکتریایی در محیط کشت بسیار بالا بود، بنابراین، به منظور کاهش این آلودگی در محیط کشت PDA از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (۱۰۰mg/l) و کلرامفنیکل (۵۰ mg/l) استفاده شد که میزان آلودگی باکتریایی به شدت کاهش یافت. بعد از جداسازی با روش میکروسکوپی وجود گونه *N. coenophialum* تایید شد. پرگنه‌های هر دو جدایه قارچ ۸۳ و ۷۵ سفید رنگ بودند اما بعد از مدتی به تدریج کرمی رنگ شدند. این تغییر رنگ در جدایه ۸۳ چشمگیرتر بود. رشد جدایه ۸۳ روی محیط کشت PDA بیشتر از جدایه ۷۵ بود و از لحاظ چین‌خوردگی و شکل ظاهری با جدایه ۷۵ متفاوت بود.

- بررسی روش‌های مایه‌زنی قارچ‌های اندوفیت

در این تحقیق ابتدا برای بالا بردن شانس انتقال قارچ به گیاه سعی شد قارچ‌های جدا شده از ژنوتیپ گیاهی ۸۳ حاوی قارچ به گیاهان عاری از قارچ اندوفیت همان ژنوتیپ و

قارچ‌های جدا شده از ژنوتیپ گیاهی ۷۵ به گیاهان ۷۵ عاری از قارچ اندوفیت انتقال پیدا کند و سپس مایه‌زنی متقابل که به وارد کردن قارچ جدا شده از یک ژنوتیپ به ژنوتیپ دیگر اطلاق می‌شود، به صورتی که قبلا شرح داده شد انجام گیرد. با استفاده از روش اول مایه‌زنی کلیه ترکیبات میزبان- قارچ شامل گیاهان ژنوتیپ ۸۳ که توسط قارچ جدایه ۸۳، گیاهان ژنوتیپ ۷۵ که توسط قارچ جدایه ۷۵، گیاهان ژنوتیپ ۷۵ که توسط قارچ جدایه ۸۳ و گیاهان ژنوتیپ ۸۳ که توسط قارچ جدایه ۷۵ مایه‌زنی شده بودند موفقیت‌آمیز بود. به منظور سهولت مطلب برای ترکیب‌های فوق از این پس به ترتیب از نمادهای Fa۸۳E۸۳، Fa۷۵E۷۵، Fa۷۵E۸۳ و Fa۸۳E۷۵ استفاده خواهد شد.

در این روش جدایه‌های قارچی ۷۵ و ۸۳ میزبان‌های طبیعی خودشان را که عاری از قارچ بودند به راحتی آلوده کردند. در روش اول درصد گیاهان آلوده Fa۸۳E۸۳ برابر ۱۹/۳ و درصد گیاهان آلوده Fa۷۵E۷۵ برابر ۱۵/۶ بود. در مورد مایه‌زنی قارچ به ژنوتیپ‌های گیاهی غیر میزبان درصد گیاهان تولید شده Fa۷۵E۸۳ و Fa۸۳E۷۵ به ترتیب برابر ۱۰/۲ و ۸/۷ بود. در مجموع گیاهچه‌های ژنوتیپ ۷۵ نسبت به ژنوتیپ ۸۳ از قدرت و بنیه بیشتری برخوردار بودند و در فرآیند مایه‌زنی، درصد مرگ و میر کمتری داشتند. بیشترین درصد موفقیت در مایه‌زنی مربوط به گیاهچه‌های Fa۸۳E۸۳ و کمترین آن مربوط به Fa۸۳E۷۵ بود.

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت بین تیمارها فقط برای گیاهان Fa۸۳E۷۵ در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD بین این سه تیمار نشان داد که بین روزهای هفتم و دهم و روزهای هفتم و چهاردهم اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد وجود دارد ولی بین روز دهم و چهاردهم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. طول کلئوپتیل در گیاهان ژنوتیپ ۸۳ در تاریکی مطلق بیشتر از گیاهان ۷۵ بود و رشد طولی سریعتر انجام می‌گرفت. رشد طولی بیشتر در گیاهان ژنوتیپ ۸۳ باعث کاهش قطر کلئوپتیل و مشکل‌تر شدن مایه‌زنی گیاهچه‌ها می‌گردید. از این رو با کوچکترین زخمی که روی گیاهچه ایجاد می‌شد، گیاهچه از بین می‌رفت. بنابراین، بهترین نتیجه برای مدت زمان بین تعداد روز از کشت بذور تا مایه‌زنی برای این ژنوتیپ در روز هفتم به دست آمد. ولی با افزایش روز تعداد گیاهان آلوده و درصد مرگ و میر گیاهچه‌های مایه‌زنی شده کاهش پیدا کرد و اختلاف بین تیمارهای مختلف معنی‌دار شد.

بیشترین میزان گیاهان Fa۸۳E۷۵ در روز هفتم این تیمار به دست آمد. کمترین میزان موفقیت در مایه‌زنی مربوط به تیمار روز چهاردهم بود که علت این امر می‌تواند نگهداری بیش از حد گیاهچه قبل از مایه‌زنی و مرگ و میر گیاهچه به علت عدم دسترسی به مواد غذایی کافی باشد.

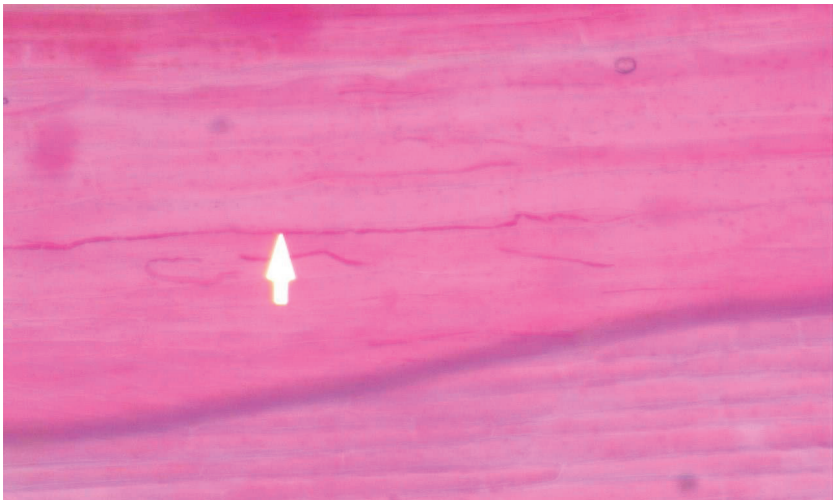
در مورد گیاهان Fa۷۵E۸۳، بین تیمارهای ۸، ۱۲ و۱۵ روز از کشت تا مایه‌زنی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱)، با این وجود بیشترین مایه‌زنی موفق متعلق به روز هشتم بود. ژنوتیپ ۷۵ دارای رشد قطری بیشتر و طول کلئوپتیل کمتری نسبت به ژنوتیپ ۸۳ بود و رشد طولی کلئوپتیل آن در هر سه تیمار تقریبا یکسان بود و به نظر می‌رسد به همین خاطر مدت زمان کشت بذر تا مایه‌زنی برای این ژنوتیپ معنی‌دار نشد و همچنین اثر چندانی بر مایه‌زنی متقابل آن نداشت. با توجه به اینکه قارچ جدایه ۸۳ نسبت به جدایه ۷۵ از رشد بهتری در محیط کشت برخوردار بود و گیاهچه‌های ژنوتیپ ۷۵ از بنیه بهتری نسبت به ژنوتیپ ۸۳ برخوردار بودند درصد مرگ و میر آن‌ها کمتر از گیاهچه‌های ژنوتیپ ۸۳ بود و مایه‌زنی در آن‌ها با موفقیت بیشتری همراه شد.

در روش دوم از ۴۱۵ بذر مایه‌زنی شده در ترکیبات مختلف هیچ گیاه حاوی قارچ به دست نیامد. درصد مرگ و میر گیاهچه‌ها در این روش بسیار بالا بود و به نظر می‌رسد چون قارچ‌ها در آندوسپرم بذر که فاقد مریستم و تقسیم سلولی سریع است قرار می‌گرفتند، قارچ‌های اندوفیت قادر به آلوده کردن گیاه نبودند. همچنین از آنجا که آندوسپرم بذر از نظر مواد غذایی بسیار غنی می‌باشد، علیرغم پوشاندن سطح بذر با نشاسته پس از مایه‌زنی، مورد هجوم قارچ‌های گندرو قرار گرفته و این قارچ‌ها نیز موجب از بین رفتن قارچ‌های اندوفیت که رشد نسبتا کمی دارند و توانایی رقابت با قارچ‌های گندرو را ندارند، شدند.

در روش سوم از ۵۰۳ پنجه که توسط دو جدایه قارچی ۸۳ و ۷۵ مایه‌زنی شدند هیچ گونه گیاهی که دارای قارچ باشد مشاهده نگردید. بعضی از پنجه‌ها در همان مراحل اولیه بر اثر شدت آسیب ناشی از مایه‌زنی از بین رفتند. در این میان سه گیاه وجود داشت که پس از گذشت ۱/۵ ماه بعد از مایه‌زنی از نظر احتمال وجود قارچ، مشکوک بودند. هر سه این گیاهان، از ژنوتیپ ۷۵ بودند که به ترتیب دو گیاه آن‌ها توسط قارچ جدایه ۷۵ و یکی از آن‌ها توسط قارچ جدایه ۸۳ مایه‌زنی شده بود. ولی بعد از گذشت سه ماه از مایه‌زنی مشخص شد که هر سه این گیاهان فاقد هر گونه قارچ اندوفیت بودند. نتایج به دست آمده با نتایج *لچ* و *کریستنسن* (۱۹۸۵) در مورد این روش مشابه بود ولی با نتایج *جانسون- سیکالس* (۲۰۰۰) مطابقت نداشت. دلیل این عدم مطابقت را احتمالا می‌توان به ژنوتیپ قارچ و گونه گیاه میزبان که مایه‌زنی می‌گردد مرتبط دانست.

- ردیابی قارچ‌های اندوفیت در میزبان جدید

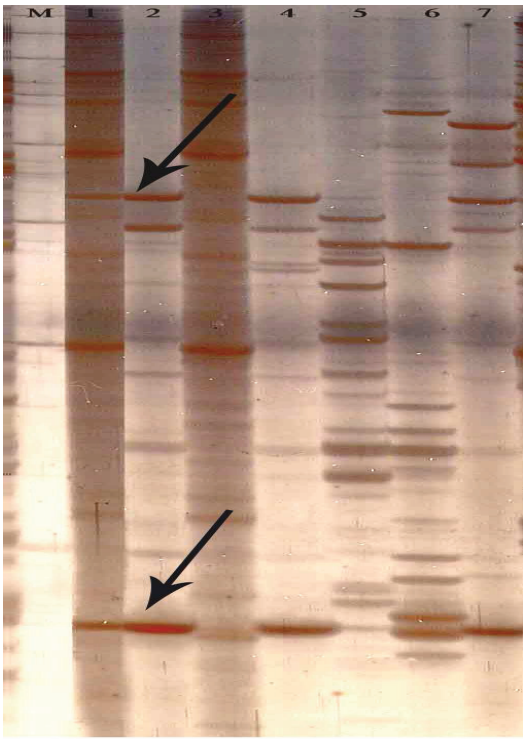
ردیابی قارچ‌های اندوفیت در میزبان‌های جدید با روش‌های میکروسکوپی مناسب انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی غلاف برگ با محلول رنگی رزبنگال، میسلیوم‌های قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شده به رنگ صورتی در فضاهای بین‌سلولی دیده شد (شکل ۱).



شکل ۱- میسلیوم قارچ اندوفیت جدایه ۸۳ در داخل گیاه ژنوتیپ ۷۵ به عنوان میزبان جدید.
Fig. 1. Mycelium of endophytic isolate 83 in plant genotype 75 as new host.

برای ردیابی قارچ‌های اندوفیت توسط نشانگر مولکولی AFLP تولید باند توسط کلون‌های گیاهی حاوی قارچ و قارچ‌های جدا شده از همان کلون‌ها و عدم تولید این باند در گیاهان عاری شده از قارچ به منزله اختصاصی بودن این باند برای قارچ مورد نظر بود. همچنین وجود این باندهای اختصاصی در گیاهان مایه‌زنی شده، نشانگر آن بود که قارچ مورد نظر در گیاهان مایه‌زنی شده وجود دارد. با توجه به این که ژنوم قارچ *Neotyphodium* کوچک است، در انجام AFLP در مرحله پیش انتخابی از آغازگرهای بدون نوکلئوتید انتخابی (صفر) و در مرحله انتخابی از آغازگرهایی با دو نوکلئوتید انتخابی استفاده شد.

در مرحله تکثیر انتخابی از آغازگرهای *Mse*I / AC - *Eco*RI / TC و *Mse*I / TA - *Eco*RI / TG با دو نوکلئوتید اضافی در انتهای ´۳ استفاده شد. آغازگر *Mse*I / AC - *Eco*RI / TC قارچ‌های اندوفیت سه گیاه از هشت گیاه مایه‌زنی شده را شناسایی کرد. این گیاهان شامل یک گیاه Fa۸۳E۸۳، یک گیاه Fa۷۵E۷۵ و یک گیاه Fa۷۵E۸۳ بودند. قارچ‌های اندوفیت پنج گیاه مایه‌زنی شده دیگر توسط این آغازگرها ردیابی نگردید. به همین دلیل از آغازگر *Mse*I / TA -*Eco*RI / TG نیز برای ردیابی قارچ‌های اندوفیت استفاده گردید. شکل ۲ مربوط به ژل الکتروفورز شده همین آغازگرها می‌باشد. در این حالت قارچ‌های اندوفیت پنج گیاه مایه‌زنی شده دیگر توسط این آغازگرها ردیابی گردید که سه گیاه شامل Fa۷۵E۸۳ بودند که در شکل ۲ مشاهده می‌شود. همچنین با استفاده از این آغازگرها قارچ‌های اندوفیت جدایه ۷۵ در دو گیاه از ژنوتیپ ۸۳ شناسایی شدند.



شکل ۲- الگوی AFLP به دست آمده از آغازگر TA / TG -*Mse*I / *Eco*RI، محتوای چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: ۱) ژنوتیپ گیاهی ۸۳ حاوی قارچ به طور طبیعی، ۲) قارچ اندوفیت جدایه ۸۳، ۳) ژنوتیپ گیاهی ۸۳ عاری از قارچ و ۷-۴) گیاهان مایه‌زنی شده Fa۷۵E۸۳.

Fig. 2. The AFLP pattern obtained from Primer / TA *Mse*I -TG / *Eco*RI, lane contents from left to right respectively: 1) Plant genotype 83 naturally infected with endophytic fungus, 2) Endophytic fungi isolate 83, 3) Plant genotype 84 free of endophyte and 4-7) Fa75E84 plants cross inoculated.

در مورد اصول کخ باید گفت مدت زمان خروج قارچ هنگامی که از غلاف گیاهان Fa۸۳E۷۵ و Fa۷۵E۸۳ برای استخراج قارچ اندوفیت استفاده شد، در مقایسه با زمانی که از گیاهان طبیعی حاوی قارچ اندوفیت استفاده شد، بیشتر بود. این مدت زمان در مورد Fa۸۳E۷۵ حدود ۱۰ روز دیرتر از حالت طبیعی و در مورد Fa۷۵E۸۳ حدود هفت روز بیشتر از حالت طبیعی بود که احتمالا به علت مقدار میسلیوم کمتر و رشد کمتر این قارچ در میزبان‌های جدید می‌باشد. قارچ جدایه ۷۵ که از گیاهان Fa۸۳E۷۵ و قارچ جدایه ۸۳ که از گیاهان Fa۷۵E۸۳ استخراج گردیدند از لحاظ ظاهری و خصوصیات مورفولوژی تفاوتی با

نمونه‌هایی قارچی که از گیاهان ۸۳ و ۷۵ در حالت طبیعی گرفته شده بود نداشتند و از لحاظ ظاهری می‌توان گفت این قارچ‌ها در این میزبان جدید تغییر محسوسی نداشتند (جدول ۱).

جدول ۱- تاثیر تعداد روز از کشت تا مایه‌زنی روی مایه‌زنی متقابل

	ژنوتیپ گیاهی ۷۵ مایه‌زنی با قارچ ۸۳			**ژنوتیپ گیاهی ۸۳ مایه‌زنی با قارچ ۷۵**		
تیمار (تعداد روز ازکشت تا مایه‌زنی)	۸	۱۲	۱۵	۷	۱۰	۱۴
میانگین تعداد	a۱/۳۸	a۱/۳۸	a۱/۲۸	a۱/۳۹	ab۱/۲۰	b۰/۸۵
گیاهان حاوی قارچ	(۱/۹۰)*	(۱/۹۰)	(۱/۶۴)	(۱/۹۴)	(۱/۴۴)	(۰/۷۳)

*در ردیف آخر تفاوت بین میانگین که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد با آزمون LSD معنی‌دار نیست. اعداد داخل پرانتز، میانگین تعداد گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ‌های اندوفیت قبل از تبدیل داده‌ها می‌باشد.

در این تحقیق از سه روش مختلف برای مایه‌زنی قارچ‌های اندوفیت به دو ژنوتیپ گیاهی تنها روش *لچ و کریستنسن* (۱۹۸۵) بود با موفقیت همراه بود و تنها از طریق این روش، قارچ‌های اندوفیت گرفته شده از یک ژنوتیپ با موفقیت وارد خود همان ژنوتیپ و ژنوتیپ دیگر شدند. به نظر می‌رسد زخم زدن و جوان بودن گیاهچه نقش بسیار مهمی درموفقیت مایه‌زنی داشته باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از آقایان دکتر قدرت ا... سعیدی و دکتر سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی به خاطر مشورت‌های ارزنده تشکر و قدردانی می‌نمایند. کمک‌های آقایان مهندس رضا محمدی، محمدرضا سبزعلیان و مهدی رحیم‌ملک قابل سپاس و تقدیر است.

منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: اسماعیل شهسواری، دکتر آقافخر میرلوحی و دکتر بهرام شریف‌نبی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و دکتر مجتبی خیام‌نکویی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج.

CROSS INOCULATION OF TWO TALL FESCUE GENOTYPES WITH *NEOTYPHODIUM ENDOPHYTIC* FUNGI AND ITS DETECTION USING AFLP MARKER

E. SHAHSAVARI, A.F. MIRLOHI, B. SHARIFNABI* and M. KHAYAM NEKOIE
College of Agriculture, Isfahan University of Technology and Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

Received: 13.11.2007 Accepted: 21.06.2008

Mutual relationship between pasture grasses and *Neotyphodium* fungal endophytes is of great importance in grass improvement. Two endophyte containing tall fescue genotypes (75 and 83) and their endophyte free ramets were used in this study. Endophytes were isolated from tall fescue genotypes 75 and 83 and used in three methods of inoculation including Latch and Christensen approach, insertion of mycelium into the seeds, and Johonson-Cicales approach. Endophytes were detected in new host using microscopic examination of stained tissues, AFLP marker and Koch's postulates. Results showed that Latch and Christensen approach was the only successful technique by which cross inoculation in the two tall fescue genotypes was feasible. Success in inoculation seems to be highly dependent on splitting procedure and seedlings age. Detection methods used to confirm the presence of inoculated endophyte in plants indicated that microscopic examination is highly accurate in detecting endophytes in new host. However AFLP marker was

* Corresponding author (E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir)

required to confirm isolate identity although it lacked detection in all infected plants examined microscopically. Koch's postulates showed that endophytic fungi had no morphological alterations after being inoculated into new host.

Key words: Symbiosis, Clavicipitaceae, AFLP, *Festuca*, Cross Inoculation

To observe the figures and table, refer to the Persian text.

References

ACON, C.W., RICHARDSON, M.O. and WHITE, J.F. 1997. Modification and uses of endophyte-enhanced turf grass: A role for molecular technology. Crop Sci. 37: 1415-1425.

BELANGER, F.C. 1996. A rapid seedling screening method for determination of fungal endophyte viability. Crop Sci. 36: 460-462.

BOUTON, J.H., LATCH, G.C.M., HILL, N.S., HOVELAND, C.S., MCCANN, M.A., WATSON, R.H., PARISH, J.A., HAWKINS, L.L. and THOMPSON, F.N. 2002. Reinfection of tall fescue cultivars with non-ergot alkaloid-producing endophytes. Agron. J. 94: 567-574.

BURNS, J.C., FISHER, D.S. and ROTTINGHAUS, G.E. 2006. Grazing influences on mass, nutritive value and persistence of stockpiled Jessup tall fescue without and with novel and wild-type fungal endophytes. Crop Sci. 46: 1898-1912.

CHEN, X., ROMAIN, C.P., TAN, Q., SCHLANGNHAUFER, B., OSPINA-GIRALDO, M.D., ROYES, D.J. and HUFF, D.R. 1999. PCR-based genotyping of epidemic and pre-epidemic *Trichoderma* isolates associated whit green mold of *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2674-2678

CHRISTENSEN, M. J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D.D. and TAPPER, B.A. 1997. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arrundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Mycol. Res. 97: 1083-1092.

DEHGHANPOUR FARSHAH, S., SHARIFNABI, B. and MIRLOHI, A.F. 2006. Application of 5.8 S gene and ITS, PCR-RFLP pattern in taxonomy of *Neotyphodium* endophytic fungi. Rostaniha 7(1): 1-15 (in Persian with English summary).

EASTON, H.S., LATCH, G.C.M., TAPPER, B.A. and BALL, O.J.P. 2002. Ryegrass host genetic control of concentrations of endophyte-derived alkaloids. Crop Sci. 42: 51-57.

GANJALI, R., SHARIFNABI, B. and MIRLOHI, A.F. 2004. Classical methods and specific primers in detection of endophyte fungi in some gramineous plants. Rostaniha 5(1): 37-51 (in Persian with English summary).

JOHNSON-CICALSE, J., SECKS, M.E., LAM, C.K., MEYER, W.A. MURPHY, J.A. and BELANGER, F.C. 2000. Cross species inoculation of chewings and strong creeping red fescues with fungal endophytes. Crop Sci. 40:1485-1489.

KEARNEY, J.F., PAROTT, W.A. and HILL, N.S. 1991. Infection of somatic embryos on tall fescue with *Acremonium coenophialum*. Crop. Sci. 31: 979-984.

LATCH, G.C. and CHRISTENSEN, M.J. 1985. Artificial infection of grasses with endophytes. Ann. Appl. Biol. 107: 17-24.

MALINOWSKI, D.P. and BELESKY, D.P. 2000. Adaptation of endophyte infected cool- season grasses to environmental stresses. Crop Sci. 40: 923-940.

MIRLOHI, A.F., SABZALIAN, M.R. and KHAYAM NEKOIE, M. 2004. Endophytic fungi, characteristics and their potential for genetic manipulation. Iran. J. Biotechnol. 2: 75-83.

PARSAEIAN, M., MIRLOHI, A.F., REZAIE, A.M. and KHAYAM NEKOIE, M. 2007. The effect of endophytic fungi on physiological characteristics and cold tolerance of two species of meadow fescue and tall fescue. J. Sci. Agric. Nat. Res. 10: 197-212 (in Persian with English summary).

SABZALIAN, M.R, HATAMI, B. and MIRLOHI, A.F. 2004. Mealybug, *Phenocccous solani*, and barley aphid, *Sipha maydis*, response to endophyte-infected tall and, meadow fescues. Entomol. Exp. Appl. 113: 205-209.

SCHARDL, C.L. 2001. *Epichloe festucae* and related mutualistic symbionts of grasses. Fungal Genet. Biol. 33: 69-82.

SIEGEL, M.R., VARNEY, D.R., JOHNSON, M., NESMITH, W.C., BUCKNER, R.C., BUSH, L.P., BURRUS, P.B. and HARDISON, J.R. 1984. A fungal endophyte of tall fescue: evaluation of control methods. Phytopathology 74: 937-941.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., THEOVAN, D.L. HORNES, M., FRIJERS, M., KUIPER, A. and ZABEAU, M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

Addresses of the authors: E. SHAHSAVARI, Former graduate student of Plant Breeding, Dr. A.F. MIRLOHI and DR. B. SHARIFNABI, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111, Iran, and DR. M. KHAYAM NEKOIE, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.