روش‌های کلاسیک و آغازگرهای اختصاصی در ردیابی قارچ‌های اندوفیت در برخی گرامینه‌های‌علفی*

Classical methods and specific primers in detection of endophytic fungi in some gramineuos plants

راشین گنجعلی، بهرام شریف نبی و آقا فخر میر لوحی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت 1383/5/28 پذیرش / /1383

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی روش‌های کلاسیک و آغازگرهای اختصاصی در ردیابی قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی تیره گندمیان صورت گرفت که در راستای این هدف بیست جدایه قارچ از چهار میزبان مرتعی *Bromus tomentellus*، *Lolium prenne*، *Festuca pratensis* و *Festuca arundinacea* جداسازی گردید. نمونه‌ها ابتدا از طریق رنگ‌آمیزی با محلول رنگی رز بنگال از نظر حضور قارچ اندوفیت آزمایش شدند، سپس نمونه‌های حاوی قارچ روی محیط‌های کشت متفاوت کشت شدند. با توجه به تفسیر دندروگرام قارچ‌های اندوفیت در هر میزبان مشابه بودند. قارچ‌های جدا شده از *F. pratensis* با *F. arundinacae* در یک گروه قرار گرفتند که این امر نشان دهنده شباهت بیشتری بین این

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، آغازگرهای اختصاصی، گرامینه‌های مرتعی، خصوصیات مورفولوژیکی

---

* بخشی از رساله کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر شریف نبی و دکتر آقا فخر میرلوحی ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

** مسئول مکاتبه

قارچها است. *DNA* قارچ‌های اندوفیت پس از استخراج با استفاده از یک گروه آغـازگرعمومی *ITS1, ITS4* و دوگروه آغازگر اختصاصی IS1, IS3 و 11-1, 11-2 طـی واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز تکثیـر شـده و حضـور قـارچ انـدوفیت *Neotyphodium* در آنـان مـورد بررسـی قـرار گرفـت. تمـام نمونه‌ها با آغازگرهای ITS1, ITS4 ایجاد باندی بین 750 ـ550 جفـت‌بـازی نمودنـد کـه ایـن بانـد بر اساس منابع موجود نشانه وجود قارچ اندوفیت است. آغازگرهـای 11-1, 11-2 بـا برخـی نمونـه‌هـا ایجاد باند 1000 جفت‌بازی نمودند که این باند مختص جنس *Neotyphodium* است. به منظور بـالا بردن دقت کار، از آغازگرهایIS1, IS3 که با قارچ‌های انـدوفیت جـنس *Neotyphodium* ایجـاد بانـد 444 جفت‌بازی می‌نماید، استفاده گردید. از میان 20 جدایه مورد آزمـایش، 18 جدایـه تولیـد بانـد 444 جفت‌بازی که مختص جدایه‌های جنس *Neotyphodium* بـود را تولیـد نمودنـد. دو جدایـه بـا نام‌های FpGon و FaSm که با آغازگرهای ITS1, ITS4 ایجاد بانـد 750 ـ550 جفـت‌بـازی نمـوده بودند، با آغازگرهای IS1, IS3 باند 444 جفت‌بازی را تولید نکردند. به احتمال زیـاد ایـن جدایـه‌هـا قارچ‌های اندوفیتی به جز گونه‌های *Neotyphodium* می‌باشند.

مقدمه

رابطه همزیستی بین قارچ‌های اندوفیت و گیاهان علفی تیره گرامینه یکی از انـواع همزیسـتی است که از دهه 1950 شناخته شده است. قارچ‌های انـدوفیت متعلـق بـه رده Ascomycetes تیـره Clavicipitaceae و قبیله Balansieae هستند که از طریق پایه مادری به نتاج منتقل می‌شوند. ایـن قارچ‌ها فواید زیادی برای گیاه میزبان خود دارند که از مزایـای ایـن رابطـه همزیسـتی مـی‌تـوان بـه مقاومت در مقابل آفات و بیماری‌ها، مقاومت در مقابل تنش‌های محیطی مثل تغییرات pH، خشکی، شوری و افزایش مقاومت به چرا، اشاره کرد

در سالهای 1950 محققان در پی‌یافتن علت بیماری دام‌هایی که در مراتع از گیاه فسـکیوی بلند تغذیه می‌کردند متوجه وجود قـارچ‌هـای انـدوفیت در ایـن گیاهـان شـدند (Bell et al.1957). ابتدا تصور براین بود که این قارچ‌ها از عوامل بیماریزای گیاه فسکیوی بلند می‌باشند و بـا حـذف آن مشکل بیماری دام‌های تغذیه کننده بر طرف خواهد شد. درپی ایـن فرضـیه اقـدامات بعـدی جهـت عاری ساختن گیاهان فسکیوی بلند از قارچ با موفقیت انجام شـد و برخـی از مراتـع و چراگـاه‌هـا بـا گیاهان فسکیوی عاری از قارچ احداث شدند.

با این اقدام معضل بیماری دام‌های تغذیـه کننـده از فسـکیوی بلنـد بـر طـرف گردیـد، امـا مشکلات جدیدی در رابطه با مدیریت چراگاه، از جمله از بین رفتن گیاهان بعد از چرا، ضعیف شدن گیاهان در مقابل تنش‌های محیطـی و آفـات و بیمـاری‌هـا بـروز نمـود (Christensen *et al.* 1991). چنین عوارضی تاثیرات مفید قارچ‌های اندوفیت را برای تامین رشد گیاهـان میزبـان خـود مشـخص

نمود و لذا در مطالعات بعدی قارچ‌های اندوفیت از نظر همزیستی مفید با فسکیوی بلند و سایر گیاهان علفی و اثرات مثبت این رابطه متقابل مورد توجه قرار گرفتند. قارچ‌های اندوفیت به صورت معمول در داخل گیاه رشد بین سلولی دارند و علایم خاصی در گیاه ایجاد نمی‌کنند، اما اثرات متفاوتی روی دام‌های تغذیه کننده از این گیاهان دارند که از آن جمله می‌توان کاهش جذب غذا، کاهش وزن، زبر شدن موها در طول فصل تابستان، کاهش تولید شیر، نکروزه شدن سم‌ها، دم و کاهش تولید مثل را ذکر نمود. معمولا دام‌های تغذیه کننده از علوفه آلوده به قارچ به علت احساس عطش، بیشتر وقتشان را در سایه و یا آب سپری می‌کنند که این اثرات سمی در نتیجه تولید موادی مانند آلکالوییدهای سمی توسط قارچ همزیست است (Melaren 1991).

ساها (Saha et al.1988) در سال 1988 رنگ‌آمیزی با استفاده از رز بنگال را برای ردیابی قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی به کار بردند. این قارچ‌ها از طریق مشخصات میسلیومی مانند قطر و انشعابات اندک قابل شناسایی هستند. *جانسون* و همکاران (Johnson *et al.* 1982) از روش ELISA برای ردیابی قارچ‌های اندوفیت استفاده کردند. در سال 1990 اختلاف ایزوزایمی با استفاده از 10 آنزیم مختلف برای گروه‌بندی این قارچ‌ها توسط *لچمن* (Leuchtman & Clay 1990) به کار برده شد. همچنین از آنتی بادی‌های مونوکلونال برای ردیابی گونه‌های *Neotyphodium* استفاده شده است (Hiatt *et al*. 1997). در سال 1995 *داس* و همکاران (Doss & Welty.1995) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) را برای بررسی وجود قارچ‌های اندوفیت در فسکیوی بلند به کار بردند. *داس* و همکاران (Doss *et al.* 1998) آغازگرهای IS1, IS3 که برمبنای توالی نوکلئوتیدی اینترون‌های 1و ژن توبولین2 طراحی شده بود را برای تشخیص این قارچ‌ها به کار بردند. *برازجانی* و همکاران (Borazjani *et al*.1998) از آغازگرهای ITS برای مقایسه گونه‌های اندوفیت جنس *Acremonium* استفاده کردند. در ایران، *خیام نکویی* و همکاران(2001) وجود اندوفیت *Neotyphodium* را در فسکیوی بلند به کمک روش‌های کلاسیک نشان داده‌اند. از آنجایی که ایران مرکز تنوع گندمیان و یکی ازخاستگاه‌های گیاهان این تیره است. بررسی گندمیان ایران از نظر اثبات حضور اندوفیت‌ها ضروری به نظر می‌رسد، از اینرو اقدام به بررسی حضور اندوفیت‌ها در چهار میزبان علفی با استفاده از روش‌های کلاسیک رنگ آمیزی و PCR با آغازگرهای اختصاصی شد.

روش بررسی

بیست نمونه غلاف برگ و بذر از میزبان‌های مختلف *Bromus tomentellus, Lolium prenne, Festuca arundinacea, Festuca paratensis* از مناطق مختلف ایران و برخی نیز از بانک ژن ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان اصفهان جمع‌آوری شد که نام جدایه‌ها و محل جمع‌آوری آنان در جدول 1 دیده می‌شود. در اولین مرحله با استفاده از محلول رنگی رز بنگال نمونه‌ها رنگ‌آمیزی شدند، پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی و اثبات وجود میسلیوم قارچ اقدام به کشت بذور و اندام‌های آلوده شد.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت از بذر

برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت از بذر ابتدا گلوم و گلومل بذر حذف شد و پس از اینکه 30-60 ثانیه در الکل 70 درصد قرار گرفتند مدت 30-50 دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم 0/5 درصد به همراه یک میلی‌لیتر Tween 20 قرار داده شدند تا کاملاً آلودگی‌های سطحی از بین بروند. پس از این مرحله چندین بار با استفاده از آب مقطر سترون آبشویی انجام شد، سپس نمونه‌ها روی محیط کشت‌های PDA,YE,CMA کشت گردیدند (khayyam Nekkouei *et al.* 200).

جداسازی قارچ‌های اندوفیت از غلاف برگ

ابتدا غلاف‌های برگ یک بار با استفاده از مایع ظرفشویی شسته شد و پس از چند بار آبکشی، به قطعاتی با طول 0/5 سانتی متر تقسیم شدند و مدت 30-60 ثانیه در الکل 70 درصد قرار گرفتند. سپس مدت 30-50 دقیقه در محلول هیپو کلریت سدیم 0/5 درصد قرار داده شدند و به مخلوط حاصل یک میلی‌لیتر Tween 20 افزوده گردید و روی همزن الکتریکی قرار داده شدند. بعد از این مدت دو بار با آب مقطر سترون، آب شویی شدند و 15-20 دقیقه در آب مقطر سترون روی همزن الکتریکی قرار داده شدند و سپس آب تخلیه شد. غلاف‌های برگ روی کاغذ صافی سترون شده قرار گرفتند تا آب اضافی آنها خارج شود. سپس چندین خراش در سطح داخلی غلاف برگ با کمک اسکالپل سترون ایجاد شد تا خروج قارچ آسان‌تر شود و در محیط کشت PDA به گونه‌ای که نصف آن از محیط کشت بیرون بماند، قرار گرفتند. تشتک‌ها پس از پوشانده‌شدن با پارافیلم مدت 1-2 ماه در دمای 22-24 درجه سانتیگراد و تاریکی قرار داده شد. قطعه‌ای از میسلیوم قارچ به محیط‌های کشت مایع GPY, M102, PBS (Bacon 1994,) انتقال داده شدند.

تعیین مشخصات مورفولوژیک اندوفیت‌ها

مشخصات مورفولوژیکی قارچ‌ها 60 روز پس از بازکشت تعیین شد در این تحقیق نه صفت مورفولوژیک شامل: حضور رنگدانه و عدم حضور رنگدانه، چین‌دار بودن پرگنه یا چین‌دار نبودن پرگنه، وجود یا عدم وجود هاله، رنگ پرگنه، نوع گلوله میسلیومی ایجاد شده روی محیط کشت مایع، داشتن پرز بلند (> 3 mm) یا داشتن پرز کوتاه (< 3 mm)، وجود بر جستگی در وسط پرگنه، قطر پرگنه و شکل پرگنه مورد بررسی قرار گرفت (جدول 2). با استفاده از نرم افزار SPSS, Ver.10 با استفاده از روش Ward مربع فاصله اقلیدسی دندروگرام مربوطه ترسیم شد.

استخراج DAN

استخراجDNA با استفاده از روش *موری* و *تامپسون* (Murry & Thopmson 1980) با تغییراتی صورت گرفت. مقدار یک گرم از میسلیوم منجمد در یک هاون چینی سترون که از قبل در فریزر سرد شده بودند ریخته شد و در حضور نیتروژن مایع پودر شد و به لوله‌های سانتریفوژ20 میلی‌لیتری منتقل شدند. مقدار 10 میلی‌لیتر از بافر استخراج به هر نمونه اضافه شد و مخلوط گردید و به مدت 30 دقیقه در حمام آب EDTA 20mM, Tris-Hcl (pH 8 100 mM, NaCl 1.4) mM,%2 (W/V) CTAB,%0.2 β-mercaptoethanol گرم 60 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و در طی این مدت محتویات لوله‌ها چند مرتبه به آرامی مخلوط شدند 6 میلی‌لیتر از مخلوط کلروفوم ـ ایزوآمیل الکل (24:1) به هر لوله محتوی نمونه‌ها اضافه شد و پس از اختلاط کامل به مدت15 دقیقه در 10/000 دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و سپس به وسیله تیپ‌های نوک بریده (Cut tip) مایع فوقانی برداشته و درون لوله سترون جدیدی ریخته شد و به اندازه 0/6 حجم محلول به آن ایزوپروپانل سرد اضافه گردید و پس از چندین بار مخلوط کردن نمونه‌ها به مدت 20ـ10 دقیقه در فریزر20- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند . در این مرحله کلاف DNA تشکیل شد که به آسانی قابل مشاهده بود . لوله‌ها به مدت 15 دقیقه در 10000 دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا DNA رسوب شود . مایع بالایی رسوب DNA به آرامی خالی شد طوری که DNA داخل لوله دست نخورده باقی ماند . رسوب DNA با استفاده از تیپ‌های نوک بریده به درون لوله‌های سانتریفوژ 1/5 میلی‌لیتری انتقال داده شد. به لوله‌های محتوی DNA500 میکرولیتر اتانول 70 درصد افزوده شد و مدت 5 دقیقه در 10/000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردید، سپس لوله‌ها در مجاورت هوا به صورت وارونه روی کاغذ جاذب رطوبت قرار داده شدند تا رسوب حاصله خشک شود. پس از این مرحله به هر لوله 700 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه افزوده شد، نمونه‌ها به مدت یک شب درون یخچال4 درجه سانتیگراد نگهداری گردید تا توده DNA داخل آب حل شود،

مقدار 3 میکرولیتر آنزیم Rnase (10mg/ml) به هر نمونه اضافه شد و لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم در° 37c نگهداری شدند. هم حجم محلول داخل هر لوله مخلوط کلروفرم ایزوآمیل الکل (24:1) به لوله‌ها افزوده و پس از مخلوط کردن ملایم به مدت دو دقیقه در 14000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محلول فوقانی لوله به آرامی و با تیپ نوک بریده به لوله 1/5 میلی‌لیتری جدید انتقال یافت. خالص‌سازی DNA به روش کلروفرم ایزوآمیل الکل مجددا تکرار گردید و پس از برداشت نهایی و انتقال آن به لوله جدید و به اندازه 0/1 حجم نمونه استات سدیم سه مولار (pH 4.8) و دو حجم اتانول خالص سرد (که قبلاً در فریزر 20- قرار داده شده بود) به آن افزوده شد و توده حاصله با اتانول 70 درصد شستشو و در شرایط آزمایشگاه خشک گردید بسته به حجم نمونه مورد نظر مقدار 100 – 50 میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد و نمونه‌ها به مدت یک شب در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد تا DNA درآب به خوبی حل شود. به منظور مشاهده کمیت و کیفیت DNA، DNA استخراج شده روی ژل آگارز 0/7 ٪ در بافر TAE الکتروفورز شد.

استفاده از آغازگرهای اختصاصی

پس از رقیق کردن DNA از آغازگرهای (ITS1(5´GCGGCCATGTAGTAGAG3´ و (ITS4(5´TCCTCCGCTTATTGATATGC3´ استفاده گردید. پس از این مرحله در نمونه‌هایی که با آغازگرهای ITS1, ITS4 ایجاد باند نمودند از آغازگرهای 11-2 ,11-1 و همچنین IS1, IS3 استفاده شد.(Dos & Welty 1995) محصولات با استفاده از ژل آگاروز 1/2 ٪ در بافرTBE الکتروفورز شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل مشاهده گردیدند. نام و توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در آزمایش، به صورت زیر است:

5´TCATACCGGCTAACCGGCAAT3´), 11-2
11-1((5´TGTTACAGGATTGGTAGAGGC3´)
IS1:( ), IS3:(5´GTCTCATCTCCGGGGCGGTAT3´)
5´GGTGTTGACCCCCCCTGATTT3´

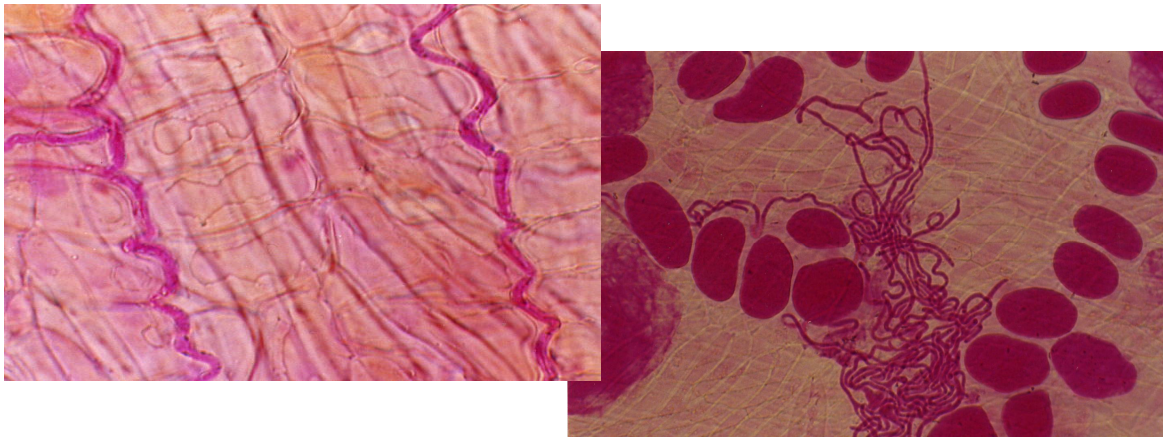
واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه محلول پایه PCR در جدول 3 آورده شده است . برای جلوگیری از بروز خطاهای احتمالی در هنگام برداشتن مقادیر کم مواد و نیز برای راحتی و سرعت عمل بیشتر، اقدام به تهیه محلول پایه، مطابق جدول 3 گردید. آنزیم *Taq* DNA polymerase و مخلوط نوکلئوتید به اضافه بافرهای مربوطه از شرکت Roche تهیه شد. کلیه وسایل و لوله‌های PCR به کار برده شده قبل از استفاده سترون شدند. برای هر مخلوط واکنش، مقدار

4 میکرولیتر از DNA (با غلظت 25 ng/µl) به 21 میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR اضافه گردید که در نهایت حجم محلول واکنش تکثیر شده به 25 µl رسید. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی سترون شده (Merk) مخلوط حاصله سریعا تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. شرایط انجام واکنش PCR در جدول 4 آورده شده است.

نتیجه و بحث

پس از رنگ‌آمیزی بذر و غلاف برگ با رزبنگال میسلیوم قارچ به رنگ قرمز صورتی دیده شدند آلودگی مسلیومی در بذر به صورت توده‌ای (شکل 1) و در غلاف برگ به صورت نواری که دارای فرورفتگی‌هایی در بین دو سلول بود، دیده شد (شکل 2).



شکل1- میسلیوم جدایه FaTsh1. در بذر *F. arundinacea*.

Fig.1.Mycelia of FaTsh1 isolate in seed of *F. arundinacea.*

شکل2- میسلیوم جدایه BtAni در غلاف برگ *B. tomentellus*.

Fig. 2. Mycelia of BtAni isolate in leaf sheath of *B.tomentellus.*

رشد قارچها روی محیط کشت PDA نسبت به سایر محیط‌های کشت سریع تر بود. محیط کشت PDA همراه آنتی بیوتیک کلرامفنیکل 50 µg/ml و استرپتومایسین 100µg/ml (*خیام نکویی* 2001) به منظور کشت غلاف برگ مناسب‌ترین محیط کشت تشخیص داده شد. پرگنه‌های قارچ‌های اندوفیت به رنگ سفید و کرم بودند و معمولاً 2-1 ماه پس از کشت ظاهر شدند. پرگنه‌های قارچ‌های حاصل از بذور *Bromus* از سرعت رشد بیشتری نسبت به پرگنه‌های قارچی

سایر بذور مورد مطالعه برخوردار بودند. پرگنه‌ها به اشکال متفاوتی دیده شد (جدول 2). داده‌های مورفولوژی به صورت داده‌های صفر و یک در نرم افزار SPSS, V.10 و با تجزیه کلاستر و ترسیم دندروگرام با استفاده از روش Ward و ضریب تشابه مربع فاصله اقلیدسی ماتریس تشابه مربوطه محاسبه و دندروگرام مربوطه رسم شد. با توجه به دندروگرام (شکل3) مشخص می‌شود که قارچ‌های اندوفیت در هر میزبان مشابه می‌باشند. اگر دندروگرام در مقیاس تغییر یافته 10 قطع شود، سه گروه اصلی تشکیل می‌شود که هر گروه مربوط به یک میزبان می‌باشد. قارچ‌های جدا شده از *F.pratensis, F.arundinacae* در یک گروه قرار می‌گیرند که این امر نشان دهنده شباهت بین قارچ‌های جدا شده از دو گونه میزبان فوق است. از این می‌توان به منظور دسته‌بندی قارچ‌های میزبان‌های مختلف استفاده نمود. *کریستنسن* و همکاران (1991) نیز با استفاده از روش تجزیه کلاستر موفق به گروه‌بندی ایزوله‌های مختلف *Acremonuim* جدا شده از گیاه میزبان rye-grass شدند. *کریستنسن* و همکاران (Christen sen *et al*. 1993) بر اساس مطالعات ایزوزایم، مشخصات مورفولوژیک، حساسیت به قارچ‌کش بنومیل در محیط کشت و تولید آلکالوییدها جدایه‌های قارچ *Acremonium* جدا شده از *F. arundinacea L. prenne* و *F. Pratensis* را در گروه‌های مجزایی قرار دادند.

از میان محیط‌های مایع، رشد روی محیط *PSB* سریع‌تر بود. در محیط مایع میسلیوم قارچ به شکل گلوله مانند (گلوله میسلیومی) در آمدند. انواع مختلفی از گلوله میسلیومی وجود داشت که می‌توان به تک گلوله میسلیومی بزرگ، تعدادی گلوله میسلیومی کوچک و گلوله میسلیومی‌های بسیار ریز اشاره کرد. با توجه به جدول 2 و شکل 3 مشخص می‌شود که قارچ‌های موجود در هر میزبان از نظر مشخصات مورفولوژیک شباهت زیادی با یکدیگر دارند. در شکل 3 زمانی که از نقطه تغییر یافته 5 قطع شود، چهار گروه اصلی دیده می‌شود که هر گروه مربوط به یک میزبان می‌باشد، در واقع قارچ‌های اندوفیت موجود در هر میزبان اختصاصی می‌باشند که این نتیجه توسط *کریستنسن* و همکاران (1991و 1993) نیز به دست آمده است. رنگ پرگنه جدایه Lp1Prellude سفید، دارای پرزهای کوتاه و شکل پرگنه گرد بود در حالی‌که در جدایه Lp2Prellude رنگ پرگنه کرم، بدون پرز و شکل پرگنه آن منظم بود، با وجود این تفاوت‌ها باز هم هر دو ایزوله فوق در یک کلاستر قرار گرفتند. این امر با مطالعات *کریستنسن* و همکاران روی طبقه‌بندی قارچ‌های اندوفیت مطابقت داشت. از این مطالعات می‌توان این گونه استنباط کرد که شکل پرگنه، پرز و رنگ پرگنه برای دسته‌بندی این قارچ‌ها مناسب نمی‌باشد و صفات مورفولوژی دیگر ظاهراً از اهمیت بیشتری در دسته‌بندی برخوردارند. جدایه BtFd با وجود تفاوت‌هایی که از نظر رنگ پرگنه، شکل پرگنه و نوع پرز با سایر اعضای جدا شده از *Bromus* دارد، اما باز این جدایه‌ها در یک کلاستر قرار گرفته‌اند، که

تأییـــد بیشـــتری در بیـــان ایـــن مطلـــب اســـت کـــه صـــفت رنـــگ پرگنـــه، شکل پرگنه و نوع پرز به تنهایی برای دسته‌بندی قارچ‌های اندوفیت مناسب نمی‌باشند. بـا توجـه بـه این‌که در این تحقیق جدایه‌هایی که از یک گونه میزبانی جمع‌آوری شده بودند بدون توجه به محـل جمع‌آوری از نظر مورفولوژی یکسان بوده و در یک گروه قرار گرفته‌اند می‌توان پی‌برد که جدایه‌های قارچی مربوط به هر میزبان احتمالاً اختصاصـی آن میزبـان بـوده و بـا قـارچ درون سـایر میزبـان‌هـا متفاوت می‌باشد.

با وجود اشکال متفاوت مورفولوژی روی محیط‌های جامد و مایع تمام نمونه‌ها با آغازگرهـای ITS1, ITS4 ایجاد باندی بین 750-550 جفت‌بازی نمودند (شـکل 4) کـه ایـن بانـد بنـا بـه نظـر *خیام نکویی* و همکاران (2001) نشانه وجود قارچ اندوفیت است. آغازگرهای 2-11 ,1-11 با برخی از نمونه‌ها ایجاد باند1000 جفت‌بازی نمودند (شکل6) که ایـن بانـد مخـتص جـنس *Neotyphodium* است (Doss 1995 & Welty). به منظور بالا بردن دقت کـار از آغازگرهـای IS1, IS3 کـه بـا DNA گونه‌های اندوفیت جنس *Neotyphodium* ایجاد باند 444جفت‌بازی مـی‌نماینـد(Doss *et al*. 1998) استفاده گردید (شکل 5). از میان 20 جدایه مورد آزمایش، دو جدایه به نام‌های FaSm, FpGon که با *آغازگرهای* ITS1,ITS4 ایجاد باند750-550 جفت‌بازی نموده بودند، با آغازگرهای IS1, IS3 بانـد 444 جفت‌بـازی را تولیـد نکردنـد. بـه احتمـال زیـاد ایـن جدایـه‌هـا قـارچ‌هـای انـدوفیت بـه جـز *Neotyphodium* می‌باشند این نتیجه توسط والتر گمس از طریق روش‌های مورفولوژیکی تاییـد شـد (مکاتبات شخصی) اما برای تایید این امر مطالعات بیشتری در زمینه مولکولی مورد نیاز است.

چاهک‌های 11 و12 مربوط به جدایه‌های *FaSm, FpGon* هستند. همـان‌طـور کـه در شـکل 5 دیده می‌شود این جدایه‌ها ایجاد باند 444 جفت بازی نکـرده‌انـد. در چاهـک 14 و 15 در شـکل 5 الگوی باندی متفاوتی دیده می‌شود که می‌تواند به علت موتاسیون، حذف شـدن، اضـافه شـدن و تغییر ترتیب قرار گرفتن ژن باشد که باعث تغییر الگوی باندی شده اسـت، بـه عنـوان مثـال اضـافه شدن می‌تواند باعث افزایش وزن مولکولی قطعه قابل تکثیر توسط این آغـازگر شـده و در نتیجـه در ناحیه بالاتر از محل قرار گرفتن باند 444 جفت‌بازی باندی تولید کند.

همان‌طور که در شکل 5 دیده می‌شود، در تمام میزبان‌ها باند 444 جفت‌بـازی تولیـد شـده است. این امر به علت شباهت ژنوم جدایه‌های قارچی گرفته شده از میزبان‌هـای متفـاوت مـی‌باشـد، باتوجه به این که آغازگرهای IS1, IS3 از روی ژن بتاتوبولین طراحی شده‌اند، احتمالا توالی این ژن در ایزوله‌های بررسی شـده مشـابه مـی‌باشـند. ایـن نتیجـه در مطالعـات *شـاردل*(Schardle 1997) به‌دست آمده است. وی نشان داد که توالی ژن بتا توبولین در گونه‌های مختلف قـارچ‌هـای انـدوفیت مشابه هستند و فقط تعداد نسخه‌های این ژن در گونه‌های مختلف، متفاوت است. با توجه به این که گمس جدایه‌های گرفته شده از *Bromus* را *Epichloë bremicola* تشخیص داده بود و این جدایه‌ها

با آغازگرهای IS1, IS3 تولید باند 444 جفت بازی نمودند، می‌توان اختمال داد که این قارچ با قارچ‌های *Neotyphodium* خویشاوندی نزدیکی دارند و دارای توالی مشترکی در ژنوم که مربوط به ژن بتا توبولین می‌باشد هستند که این امر با نتایج *شاردل* (1997) مطابقت دارد.

با توجه به تحقیق انجام شده، می‌توان گفت قارچ‌های اندوفیت بین میزبان‌های مختلف متفاوت می‌باشند، همچنین درون هر گونه میزبانی نیز قارچ‌هایی یافت می‌شوند که از نظر ژنتیکی متفاوت هستند. این تفاوت درون یک توده بذری نیز مشاهده گردید و حتی درون یک بذر نیز قارچ‌هایی یافت شد که از نظر مورفولوژیکی متفاوت بودند. با توجه به سطح وسیع تنوع در بین قارچ‌های اندوفیت و نیز با توجه به این نکته که تولید آلکالویید بستگی به ژنوتیپ میزبان و ژنوتیپ قارچ دارد. احتمالا این جدایه‌ها از نظر میزان و نوع تولید آلکالوییدهای مختلف و در نتیجه اعطای شدت مقاومت گیاه میزبان در رابطه با کنترل بیولوژیک، و همچنین عدم تولید آلکالوییدهای زیان‌آور برای دام با یکدیگر متفاوت می‌باشند، که پی‌بردن به این مهم احتیاج به مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای دکتر مجتبی خیام نکویی به خاطر در اختیار گذاشتن برخی مواد گیاهی و مشاورت پایان‌نامه و از آقای دکتر مسعود بهار به لحاظ هم‌فکری و ارایه راهنمایی‌های ارزنده صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

نشانی نگارندگان: راشین گنجعلی، دکتر بهرام شریف نبی و دکتر آقا فخر میرلوحی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، منابع 84154 اصفهان.

r_ganjali2000@yahoo.com:

sharifna@cc.iut.ac.ir

mirlohi@cc.iut.ac.ir

جدول1- جدایه‌های مورد استفاده و مکان جمع‌آوری آنها.

Table 1. Isolates and their collection localities, used in this study.

ردیف Ser. No.	نام جدایه Isolate	میزبان Host species	محل جمع‌آوری Location
1	FpGan1	*Festuca paratensis*	بروجن- منطقه گندمان
2	FpGan2	*Festuca paratensis*	بروجن- منطقه گندمان
3	FpGan3	*Festuca paratensis*	بروجن- منطقه گندمان
4	FpGon	*Festuca paratensis*	گرگان
5	FaFh	*Festuca arundinacea*	اصفهان- فزوه
6	FaTsh1	*Festuca arundinacea*	کردستان- منطقه توانکش
7	FaTsh2	*Festuca arundinacea*	کردستان- منطقه توانکش
8	FaA1	*Festuca arundinacea*	اردبیل- منطقه ولی عصر
9	FaFn1	*Festuca arundinacea*	مشهد- فریمان
10	FaFn2	*Festuca arundinacea*	مشهد- فریمان
11	Fasm	*Festuca arundinacea*	اصفهان- سمیرم
12	BtFh	*Bromus tomentellus*	اصفهان – فزوه
13	BtFd	*Bromus tomentellus*	اصفهان – قرق فخر آباد
14	BtMh	*Bromus tomentellus*	اصفهان – قرق موته
15	BtAbi	*Bromus tomentellus*	اصفهان – قرق آبخیزداری
16	BtAni	*Bromus tomentellus*	اصفهان – قرق انصاری
17	LpIn	*Lolium prenne*	اصفهان
18	LpApm	*Lolium prenne*	واریته اصلاح شده - آمریکا
19	Lp1Prellude	*Lolium prenne*	واریته اصلاح شده - آمریکا
20	Lp2Prellude	*Lolium prenne*	واریته اصلاح شده - آمریکا

جـدول 2- مشخصـات توصـیفی جدایـه‌هـای انـدوفیت از میزبـان‌هـای مختلـف علفـی در روی محیط کشت جامد PDA.

Table 2. Description of endophytic fungi colonies isolated from various graminous plant on PDA medium.

ردیف	کد جدایه	وجود رنگدانه در محیط کشت	چین‌دار بودن پرگنه	هاله	رنگ پرگنه	شکل پرگنه	داشتن پرز بلند	برجستگی در وسط پرگنه	قطر پرگنه پس از 60 روز (mm)
1	FpGan1	+	+	-	کرم	منظم	-	-	12-13
2	FpGan2	+	+	-	کرم	منظم	-	-	10-11
3	FpGan2	+	+	-	کرم	منظم	-	-	10-11
4	FpGon	+	+	-	کرم	منظم	-	-	4-6
5	FaFh	+	+	-	کرم	منظم	-	-	5-7
6	FaTsh1	+	+	-	کرم	منظم		-	5-7
7	FaTsh2	+	+	-	کرم	منظم	-	-	7-11
8	FaA1	+	+	-	کرم	منظم	-	-	5-7
9	FaFn1	+	+	-	کرم	منظم	-	-	5-7
10	FaFn2	+	+	-	کرم	منظم	-	-	5-7
11	Fasm	+	+	-	کرم	منظم	-	-	5-7
12	BtFh	-	-	+	سفید	گرد	+	+	20-33
13	BtFd	-	+	-	کرم	نامنظم	-	-	2-3
14	BtMh	-	-	+	کرم	گرد	+	+	25
15	BtAbi	-	-	+	سفید	گرد	+	+	19-26
16	BtAni	-	-	+	سفید	گرد	+	+	25
17	LpIn	+	+	-	کرم	منظم	-	-	15
18	LpApm	+	+	-	کرم	نامنظم	-	-	2-3
19	Lp1Prel	+	+	-	سفید	گرد	-	-	15
20	Lp2Prel	+	+	-	کرم	منظم	-	-	12

جدول3- مواد لازم و مقدار آن برای تهیه محلول پایه واکنش PCR.

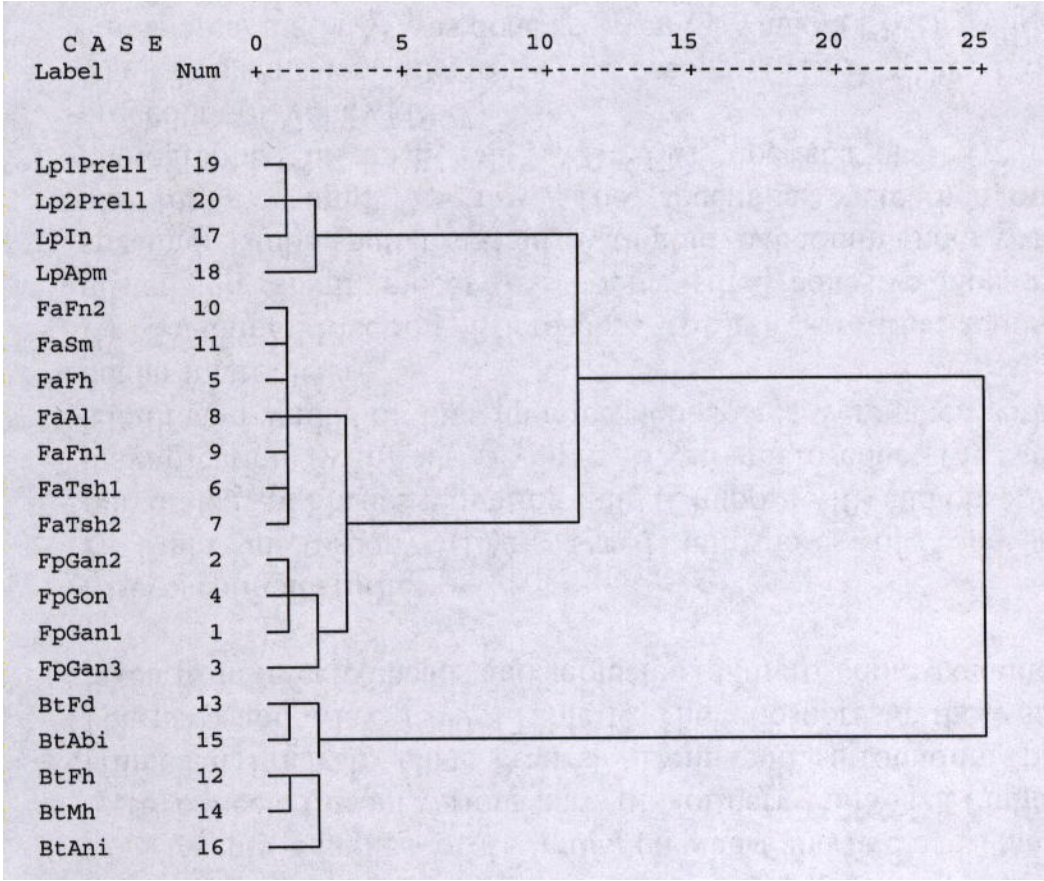
Table 3. Materials and their quantities used for PCR amplification.

ماده	غلظت پایه	غلظت نهایی	حجم برای یک واکنش
آب دو بار تقطیر			14/85µl
بافر PCR با 15 mM کلرید منیزیم	10X	1 X	2/5µl
dNTPs	10mM	0/2X	0/5Ml
هر آغازگر	12/5 µ M	12/5 µ M	1/1µl
آنزیم *Taq* DNA پلیمراز	5unit / µl	0/75unit	0/075µl
			20µl

جدول4- زمان و دمای لازم برای سه مرحله مختلف PCR بـرای آغازگرهـای ITS1, ITS4 – IS1, IS3 – 11-1, 11-2.

Table 4. Tempereture and time used for PCR ampilification using primers 11-1, 11-2, IS1, IS3, ITS1,ITS4

تعداد دور	**مرحله انجام**	**زمان**	درجه حرارت (سانتی‌گراد)
		3 دقیقه (ITS)	94
1 دور	**واسرشت**(denaturation)	1 دقیقه (11, IS)	
	واسرشت	1 دقیقه	94
		2 دقیقه(IS)	**50**
35 دور	اتصال (annealing)	1 دقیقه(IS)	60
		1 دقیقه (11)	**68**
	گسترش(extension)	2 دقیقه	72
1 دور	**گسترش نهایی**	10 دقیقه	72



شکل3- دندروگرام مربوط به داده‌های مورفولوژی در نرم افزارSPSS V.10 با استفاده از روشWardو مربع فاصله اقلیدسی.

Fig. 3. Dendrogram of morphological data using Ward Method and squared Euclidean distance using SPSS V.10 program

M 1 2 3 4 5 6 7

شکل4- ایجاد باند 750-550 جفت‌بازی در چند جدایه از جدایه‌های بررسی شده که حاصل تکثیر ITS4 با آغازگرهای ITS1, ITS4 می‌باشند.

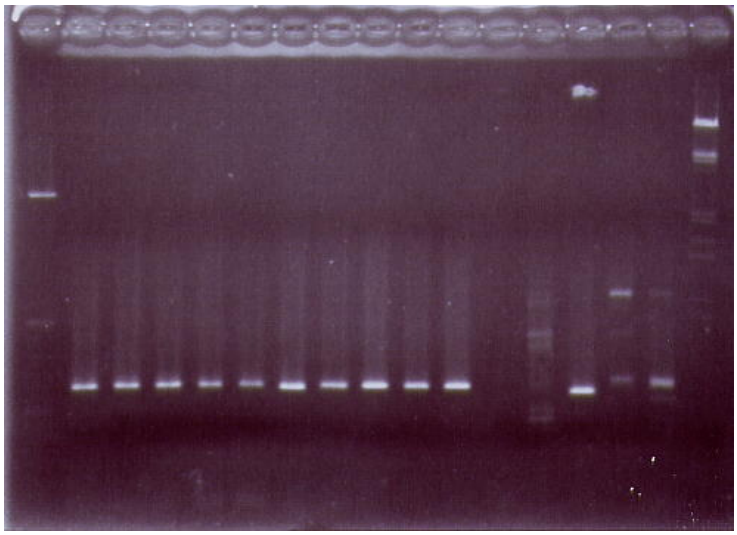
Fig. 4. A 550-750 bp band produced in some isolates with ITS1, ITS4.

1- FpGan1 2-FaFh 3-BtAbi 4-BtMh 5-LpApm 6-Lp1prellude 7-Lp2prellude

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 L

550-750 bp

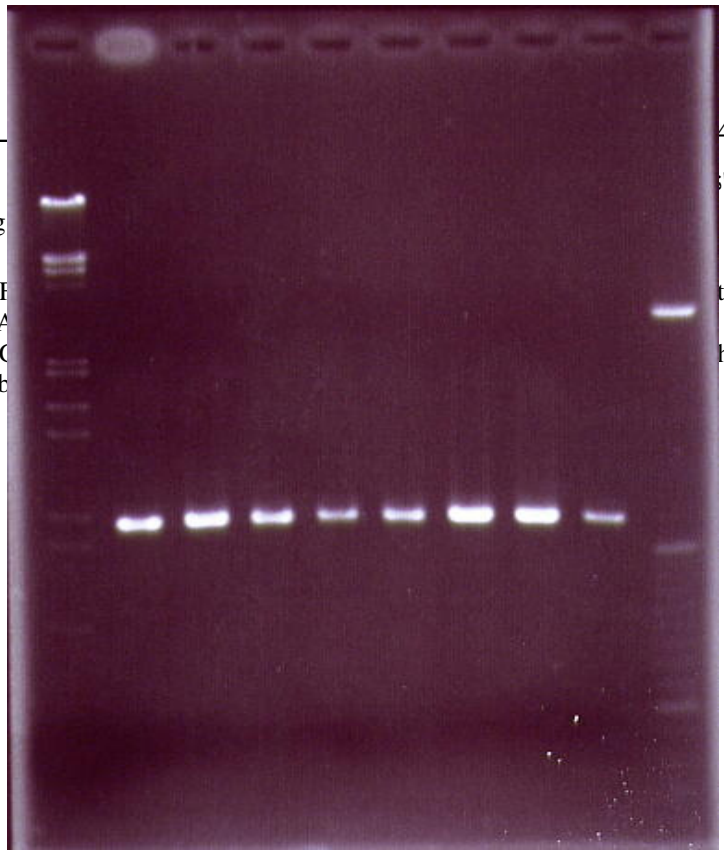
444 bp



شکل 5- ایجاد باند 4
ای
مختلف از قارچ‌های ا

Fig

1- F
tFd 9- BtMh 10-
BtA
FpG
he) L- Ladder
50b



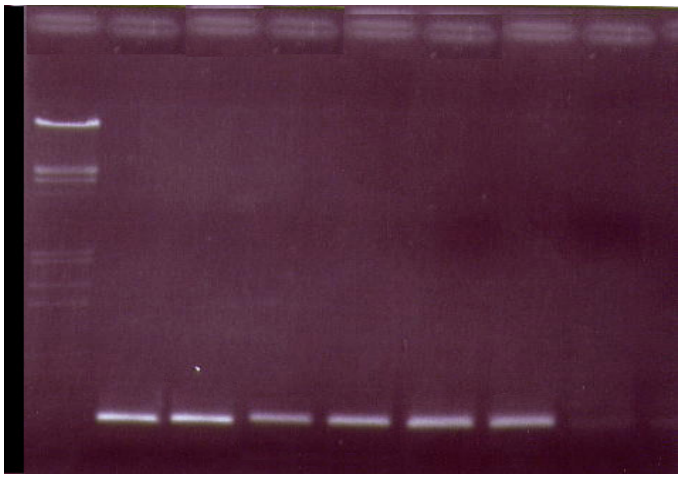
L

1000 bp

شکل 6- ایجاد باند 1000 جفت‌بازی که پس از تکثیر PCR با آغازگرهای 11-2 ,11-1 در جدایه‌های مختلف از قارچ‌های اندوفیت مورد مطالعه به‌دست آمده است.

Fig. 6. A 1000 bp band produced in some isolates with 11-1, 11-2.

1- FpGan3 2-FaFh 3-FaTsh1 4-FaFn1 5-FaAl 6-FaFn2 7-BtAni 8-BtMh M-Life Marker III (Roche) L-Ladder 50bp (techlologies)



CLASSICAL METHODS AND SPECIFIC PRIMERS IN DETECTION OF ENDOPHYTIC FUNGI IN SOME GRAMINEUOS PLANTS

RASHIN GANJALI, BAHRAM SHARIFNABI and AGHA FAKHR MIRLOHI

Isfahan University of Technology, ISfahan, Iran

Received 18/08/2004 Accepted / /2004

Abstract

Mutual relationship between endophytic fungi and some gramineuos plants is one of the recently known host-microbe interactions. Endophytic fungi are classified in class Ascomycetes, order Hypocreales, tribe Balansieae and mostly genus *Neotyphodium*. They are transferred into the progeny *via* maternal stock and have many benificial effects to their host plants, such as resistance to pests and diseases, environmental stresses such as pH fluctuation, drought, salinity and grazing. because Iran has a wide range of plant genomic resources and is known as one of the origins of gramineous plants, it is necessary to know more about endophytic fungi and their presence by using classical and molecular methods. Twenty isolates of endophytic fungi were obtained from seed and leaf sheaths of *Bromus tomentellus*, *Lolium prenne*, *Festuca arundinacea* and *Festuca pratensis*. Mycelia of endophytic fungi were observed red or pink in seed and leaf sheath when stained by Rose Bengal. The DNA of endophytic fungi was extracted by Murry and Thompson method with minor modification. In order to confirm the identity of endophytes, three universal and specific primer e. g. ITS1, ITS4, IS1, IS3, and 11-1, 11-2 were used. All isolates showed a 550-750 bp band with ITS1, ITS4 and eighteen of them showed a 444 bp band with IS1, IS3 primers, which is an indicator of *Neotyphodium* endophytes. when primers 11-1, 11-2 were used, a 1000 bp band was not observed in all isolates. Isolates FaSm and FpGon3 that did not have shown a 444 bp band, may probably differ from *Neotyphodium* endophytic fungi.

Key words: Endophytes, specific primers, gramineous plants, Morphological characters

To look at the feguses, pleas refer to the Persian text)Peges:).

Addreses of the authors: R. GANGALI, Dr. B. SHARIFNABI and Dr. A. MIRLOHI.

Former graduate student of Agricultural Biotechnology, Assistant Professor of Mycology and Assosiate Professor of Plant breeding, respectively, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 84154, Iran.

E-mail: r_ganjali2000@yahoo.com
sharifna@cc.iut.ac.ir
mirlohi@cc.iut.ac.ir

References:

BELL, M.C., Ma, C.S., MERRIMAN, G.M., and UDERWOOD, J.K. 1957. The effects of festuca forage and seed on laboratory animals. J. Anim. Sci. 16: 1083.

BORAZJANI R.N., LOTT, T. J.and AHEARN D.G. 1998. Comparison of 5.8 S and ITS2 rDNA RFLP patterns among isolates of *Acremonium obclavatum*, A. killiens and A. strictum from diverse sources. Current Microbiology 36: 70-74.

CHRISTENSEN, M.J. LATCH, G.C. M. and TAPPER, B.A. 1991. Variation within isolates of *Acremonium* endophyte from Perennial rye grasses. Mycol. Res. 95: 918-923.

CHRISTENSEN, M.J., LEUTCHMAN.A., ROWAN. D.D. and TAPPER, B.A.1993. Taxonomy of *Acremonium* endophyte of tall fescue (*Festuca arundinacea*) meadow fescue (*Festuca pratensis*) and perennial rye grass (*Lolium prenne*). Mycol. Res. 96: 1083-1092.

DOSS, R.P. Clement, S.L. and Welty 1998. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. Plant Dis. 82: 738-740.

DOSS, R.P. and WELTY, R.E. 1995. A polymerase chain reaction -based procedure for detection of *A cremonium coenophialum* in tall fescue. Phytopathology 85: 913-917.

HIATT, E.E. , HILL, N.S. , BOUTON, J.H. and MIMS. C.W. 1997. Monoclonal antibodies for d etection of *Neotyphodium coenophialum*. Crop Sci. 37: 1265-1269.

JOHNSON, M.C., PIRONE , T.P., SIEGEL, M, R. and VARNEY D.R. 1982. Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Phytopathology 72: 647- 650.

KHAYYAM-NEKOUEI. M., MIRLOHI, A. F., NADERI SAHAB, M., MOEN, S., MANAF ALI, A. and NAPIS, S. 2001. Prevalencs and viability assessment of endophytic fungi in Iranian tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 9: 60- 66.

LEUCHTMAN, A. and CLAY, K. 1990. Isozyme variation in the *Acremonium-Epichloe* fungal-endophyte complex. Phytopathology 80. 1133-1139.

MELAREN, J.B. and FRIBOURY, H.A. 1991. Early history of tall fescue toxicosis studies in Tennesse. Tennesse Farm and Home Sci.160: 4-9.

MURREY, M.G. and THOMPSON, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Res. 8: 4321-4325.

SAHA, D.C. JACKSON, M.A. and JOHNSON-CICASLE, J. M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grass. Phytopathology 48: 237-239.

SCHARDL, C.L.and PHILLIPS, T.D. 1997. Protective grass endophytes: where are they from and where are they going? Plant Dis. 81: 430-438.

Bacon, C.W. and WHITE, J.F. 1994. Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC Press, Inc. P. 214.

Liu, D., van HEESWIJC, R., LATCH, G., LEONOFORTE, T., PANACCIO, M., LANGFORD, G., CUNNINGHAM. P. and REED, K. 1995.Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coeophialum* endophytes through arbitrarily Primed PCR. FEMS Microbiology Letters. 133: 95-98.

****