رستنیها، جلد ۱۰(۱)، ۱۳۸۸

تنوع ژنتیکی قارچ های اندوفیت از جنس *Neotyphodium* در سه گونه از گندمیان ایران با استفاده از نشانگر های مولکولی AFLP*

Genetic diversity of *Neotyphodium* fungal endophytes in three Iranian grass species using AFLP molecular markers

سمیه کریمی، آقا فخر میرلوحی، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و بهرام شریف نبی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت: ۱۳۸۷/۸/۲۹ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۲۳

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی قارچ های اندوفیت از جنس *Neotyphodium* در گندمیان *Festuca arundinacea*، *F. pratensis* و *Lolium prenne* با استفاده از نشانگر های مولکولی AFLP مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور قارچ های اندوفیت از غلاف برگ گیاهان جدا و خالص سازی شدند. براساس خصوصیات مورفولوژیکی قارچ های اندوفیت جنس *Neotyphodium* انتخاب گردید. ترکیب آغازگری IS3/IS1 با قارچ های انتخابی، باند ۴۴۴ جفت بازی که اختصاصی جنس *Neotyphodium* است را تکثیر نمود که موید شناسایی درست مورفولوژیک جنس قارچ های مورد نظر بود. تجزیه خوشه ای براساس نشانگر های مولکولی

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر آقا فخر میرلوحی و دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

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

AFLP با هشت ترکیب آغازگری جدایه های اندوفیت را به طور کامل به سه دسته، منطبق با میزبان گیاهی، تقسیم کرد. همچنین بررسی ضرایب تشابه، فاصله ژنتیکی کمتری را بین *N. lolii* و *N. uncinatum* نسبت به *N. coenophialum* اثبات کرد. سطوح متفاوت پلوییدی میزبان های گیاهی به خوبی تناقض به وجود آمده در دسته بندی قارچ ها را توجیه می نماید.

واژه های کلیدی: گندمیان، قارچ *Neotyphodium*، *Festuca*، همزیستی، AFLP

مقدمه

اندوفیت میکروارگانسیمی است اعم از قارچ یا باکتری که به صورت همزیست داخل گیاه رشد می کند و معمولا در بسیاری از گیاهان یافت می شود. در چند دهه اخیر که بهنژادگران گیاهی از حضور قارچ اندوفیت *Neotyphodium* در گیاهان وحشی تیره گرامینه آگاهی یافته اند، قادرند به طور مؤثرتری منابع ژنتیکی جدیدی از مقاومت به حشرات و تحمل به تنش های محیطی را انتخاب نمایند. نگهداری جوامع میکروبی سودمند (از قبیل قارچ ها و باکتری ها) در میزبان های زراعی می تواند به پایداری تولید منجر گردد و اثر متقابل ژنوتیپ و محیط را کاهش دهد. چنین جوامع میکروبی، منابع ژرم‌پلاسم جدیدی برای انتخاب گیاهان در مقابل انواع تنش های زیستی و غیر زیستی را در اختیار محققان قرار خواهند داد (Bumerl & Mika 1991, Parsaeian *et al*. 2007, Mirlohi *et al*. 2004).

قارچ های اندوفیت که سابقا در جنس *Acremonium* طبقه بندی می شدند، براساس خصوصیات مورفولوژیکی و تجزیه و تحلیل توالی DNA به جنس جدید *Neotyphodium* نسبت داده شده اند و آنامورف گونه های *Epichloë* spp. می باشند. با این طبقه بندی همه آرایه های قدیمی اندوفیت های همزیست گندمیان مربوط به جنس *Acremonium* هم اکنون به جنس *Neotyphodium* منتقل شده اند (Marschall *et al*. 1999, Doss *et al*. 1998, Glenn *et al*. 1996).

پیشرفت در بیولوژی مولکولی شامل: هیبریداسیون مولکولی، همسانه سازی، هضم انحصاری اندونوکلئازی، نمایش مقطع عرضی پروتئین ها و توالی‌یابی اسید های نوکلئیک، ابزارهای جدید بسیاری را برای بررسی ارتباطات فیلوژنتیکی به خصوص در میان میکروارگانیسم هایی همچون اندوفیت ها فراهم کرده است که با توجه به اطلاعات مورد نیاز بهترین و مناسبترین روش می تواند به کار گرفته شود. *لوختمن* و *کلی* (Leuchtmann & Clay 1990) تنوع آیزوزایمی را برای گروه بندی اندوفیت های جنس *Epichloë* و شکل های غیرجنسی آن ها *Neotyphodium* به کار بردند. الگوی الکتروفورزی

تفاوت های چندانی را بین اندوفیت های با تکثیر جنسی و غیرجنسی نشان نداد ولی اندوفیت ها از جمعیت ها و گونه های میزبانی متفاوت الگو های باندی آنزیمی متمایزی را نشان دادند. *کریستنسن* و همکاران (Christensen *et al*. 1993) نیز تجزیه و تحلیل آیزوزایمی را برای متمایز کردن جدایه های اندوفیت و یافتن گروه بندی تاکسونومیکی ویژه سه گونه گندمیان، *Festuca arundinacea*، *F. pratensis* و *Lolium prenne* به کار بردند.

در کنار نشانگر های بیوشیمیایی، نشانگر های مبتنی بر واکنش های زنجیره‌ای پلیمراز، PCR، در تشخیص و یافتن قارچ های اندوفیت گندمیان به کار گرفته شده اند. نشانگر های مولکولی مانند توالی های ساده تکرار شونده، (Simple Sequence Repeats=SSR)، چند شکلی های طولی قطعات تکثیر شده، (Amplified Fragment Length Polymorphisms=AFLP)، وسیله ای را برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی در داخل و بین گروه های اندوفیت فراهم نموده، بینشی را در ارتباط با تنوع اندوفیت ها و تغییر پذیری خصوصیات زراعی میزبان ایجاد می کنند (Jong *et al*. 2003).

گروپ و *بولر* (Groppe & Boller 1997) پس از اینکه گستردگی مکان های ژنی میکروساتلایت را در قارچ ها نشان دادند این روش را به عنوان یک نشانگر مفید برای بررسی تنوع در میان آن ها معرفی کردند. *مون* و همکاران (Moon *et al*. 1998) از مایکروساتلایت ها به منظور شناسایی تنوع ژنتیکی قارچ های اندوفیت همزیست با چندین علف گرامینه از جمله فسکیوی بلند و رای گراس چندساله استفاده کردند و مشخص نمودند، توالی های $(CT)_n$، $(AT)_n$ و $(ATC)_n$ تکرارهای غالب در نشانگر های SSR در میان قارچ های اندوفیت بودند.

جونگ و همکاران (Jong *et al*. 2003) مطالعه ای انجام دادند که هدف آن توسعه نشانگر های مولکولی براساس مکان های توالی های کوتاه تکرار شونده (SSR) برای شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی بین اندوفیت های نئوتایفودیوم در گندمیان بود. آن ها با مقایسه توالی های بروز یافته نشاندار، Expressed Sequence Tag (EST)، از *N. coenophialum* و *N. lolii*، موفق شدند مکان های ژنی منحصر به فرد SSR را در ۹/۷ درصد از توالی های EST مربوط به *N. coenophialum* و ۶/۳ درصد از توالی های EST مربوط به *N. lolii* شناسایی کنند. همچنین این محققان در مطالعه خود، نشانگر های AFLP را نیز به‌کار بردند و ضمن معرفی SSR به عنوان نشانگر برتر، نشانگر هایAFLP را مناسب برای تشخیص و تعیین رده بندی اندوفیت و ارزیابی تنوع داخل گونه ای جمعیت که شاید با تنوع برای صفات زراعی ناشی از همزیستی با قارچ همبستگی داشته باشد، معرفی نمودند (Jong *et al*. 2003). پیش از این نیز *تردوی* و همکاران (Tredway *et al*. 1999) تجزیه و تحلیل چند شکلی طولی قطعات تکثیر شده (AFLP) را برای تخمین ارتباطات فیلوژنتیکی میان قارچ های *Epichloë* و

Neotyphodium استفاده و نتیجه گرفتند که روند تکامل میزبان گیاهی و قارچ همزیست متاثر از یکدیگر است و تکنیک AFLP کارایی بالایی در تعیین فیلوژنی قارچ ها دارد.

اندوفیت های *Neotyphodium* در گستره وسیعی از گندمیان سردسیری در سراسر جهان گزارش شده اند. در ایران نیز *خیام نکویی* و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از روش های کلاسیک رنگ آمیزی وجود اندوفیت *Neotyphodium* را در فسکیوی بلند گزارش کردند (Khayyam Nekouei *et al*. 2001). *گنجعلی* و همکاران (۲۰۰۴) از آغازگرهای اختصاصی و روش های کلاسیک برای ردیابی قارچ های اندوفیت در برخی از گرامینه های علفی استفاده کرده و نشان دادند که قارچ های اندوفیت بین میزبان های مختلف متفاوت می باشند (Ganjali *et al.* 2004). *دهقانپور* و همکاران (۲۰۰۵) نیز با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، گونه های اندوفیت در چندین میزبان گرامینه ایرانی از جمله *Festuca* و *Lolium* را مورد بررسی و شناسایی قرار دادند (Dehghanpour *et al*. 2005). *دهقانپور* و همکاران همچنین در مقایسه ای میان نتایج حاصل از دسته بندی براساس خصوصیات مورفولوژیک و نشانگر های مولکولی برای اولین بار در ایران نشان دادند که نتایج حاصل از نشانگر های مولکولی PCR-RFLP نتایج حاصل از داده های مورفولوژیک را تایید می نماید (Dehghanpour *et al*. 2006).

در پژوهش حاضر، تنوع ژنتیکی قارچ های *Neotyphodium* همزیست گندمیان ایران *F. arundinacea*، *F. pratensis* و *L. prenne* با استفاده از تکنیک AFLP مورد بررسی قرار گرفت و تلاش شد تا رابطه ژنتیکی این قارچ ها در یک مقایسه بین گونه ای روشن گردد.

روش بررسی

مواد گیاهی

در این مطالعه، از ۱۱ ژنوتیپ *Festuca arundinacea*، هفت ژنوتیپ *F. pratensis* و شش ژنوتیپ *Lolium perenne* که به طور تصادفی از میان توده های جمع آوری شده از رویشگاه های طبیعی انتخاب گردیدند استفاده شد (جدول ۱). برای اطمینان از وجود قارچ در این ژنوتیپ ها و مشاهده قارچ های اندوفیت در غلاف برگ قبل از جدا سازی، از رنگ آمیزی با رزبنگال استفاده شد (Saha *et al.* 1988).

۱- جدا سازی و خالص سازی قارچ اندوفیت

جدا سازی قارچ های اندوفیت از غلاف برگ ژنوتیپ های گیاهی (جدول ۱) طبق روش به کار گرفته شده توسط *گنجعلی* و همکاران (Ganjali *et al*. 2004) انجام گردید. پس‌از بریدن غلاف های برگ از پایه مادری ابتدا با مایع ظرفشویی شستشو داده شدند و پس از چند بار

جدول ۱- جدایه های مورد استفاده و مکان جمع آوری آن ها

Table 1.Geographical location and list of isolates used in this study

ردیف No.	محل جمع آوری Location	نام علمی میزبان Host Species	کد جدایه Isolate Code
1	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*Festuca arundinaceae*	FaGn1
2	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. arundinaceae*	FaGn2
3	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. arundinaceae*	FaGn3
4	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. arundinaceae*	FaGn4
5	Charmahal va Bakhtiari: Glogerd	*F. arundinaceae*	FaGd1
6	Charmahal va Bakhtiari: Glogerd	*F. arundinaceae*	FaGd2
7	Charmahal va Bakhtiari: Glogerd	*F. arundinaceae*	FaGd3
8	Charmahal va Bakhtiari: Glogerd	*F. arundinaceae*	FaGd4
9	Kordestan: Kamyaran	*F. arundinaceae*	FaKn1
10	Kordestan: Kamyaran	*F. arundinaceae*	FaKn2
11	Kordestan: Kamyaran	*F. arundinaceae*	FaKn3
12	Charmahal va Bakhtiari: Borojen	*F. pratensis*	FpBn1
13	Charmahal va Bakhtiari: Borojen	*F. pratensis*	FpBn2
14	Charmahal va Bakhtiari: Borojen	*F. pratensis*	FpBn3
15	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. pratensis*	FpGna1
16	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. pratensis*	FpGna2
17	Charmahal va Bakhtiari: Andoman	*F. pratensis*	FpGnb1
18	Charmahal va Bakhtiari: Gandoman	*F. pratensis*	FpGnb2
19	Lorestan: Borojerd	*Lolium prenne*	LpBd1
20	Lorestan: Borojerd	*L. prenne*	LpBd2
21	Lorestan: Borojerd	*L. prenne*	LpBd3
22	Lorestan: Borojerd	*L. prenne*	LpBd4
23	W. Azarbaijan: Naghadeh	*L. prenne*	LpNh1
24	W. Azarbaijan: Naghadeh	*L. prenne*	LpNh2

آبکشی به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد ضد عفونی گردیدند. در مرحله دوم غلاف ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد که دارای یک میلی لیتر Tween 20 در ۱۰۰ میلی لیتر محلول بود قرار گرفتند و به مدت ۴۵-۳۵ دقیقه روی یک همزن الکتریکی قرار داده شدند. سپس غلاف ها سه مرتبه با آب مقطر سترون آبکشی و به قطعات ۰/۵ سانتی متری بریده شدند و به کمک اسکالپل خراش هایی روی سطح آن ها، به منظور سرعت بخشیدن به خروج قارچ ها، ایجاد شد. غلاف های ضد عفونی شده روی محیط کشت Potato Dextrose Agar سترون شده همراه با آنتی بیوتیک های تتراسایکلین، استرپتومایسین و آمپی‌سیلین هر کدام با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی لیتر قرار داده شدند، به طوری که نصف غلاف بالای سطح محیط کشت قرار گرفت. تشتک های پتری بعد از پوشانده شدن با پارافیلم در انکوباتور با دمای ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس در تاریکی قرار گرفتند. خالص سازی قارچ های رشد کرده، روی محیط کشت WA با استفاده از روش نوک ریسه انجام شد.

پس از جدا سازی و خالص نمودن قارچ های اندوفیت، صفات مورفولوژیکی مانند خصوصیات پرگنه، شکل و رنگ آن از رو و پشت تشتک پتری، شکل حاشیه پرگنه، مسطح یا برآمده بودن پرگنه، هاله دار یا بدون هاله بودن آن، وضعیت میسلیوم های هوایی و وضعیت چین خوردگی پرگنه های مختلف بررسی شد و با استفاده از کلید های قارچ شناسی به کار گرفته شده توسط *دهقانپور* و همکاران (Dehghanpour *et al.* 2005) شناسایی قارچ ها انجام شد.

۲- استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

استخراج DNA قارچی براساس روش *ماری* و *تامسون* (Murray & Thompson 1980) تغییر یافته توسط *گنجعلی* و همکاران انجام گرفت (Ganjali *et al.* 2004). پس از رقیق کردن نمونه های DNA قارچ، از آغازگر های اختصاصی IS1 (5'-GGTGTTGAGCCCCCCTGATTT-3') و IS3 (5'-GTCTCATCTCCGGGGCGGTAT-3') برای تکثیر باند ۴۴۴ جفت بازی که ویژه قارچ های جنس *Neotyphodium* است استفاده شد (Doss & Welty 1995). مواد مورد نیاز و مراحل انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز طبق روش ارایه شده توسط *گنجعلی* و همکاران (Ganjali *et al.* 2004) صورت گرفت.

۳- تکثیر قطعات طولی چند شکل (AFLP)

تکنیک AFLP براساس روش *وس* و همکاران (Vos *et al.* 1995) با انجام تغییرات و اصلاحات در کلیه مراحل اجرا گردید. ابتدا از ترکـیب دو آنزیم *Pst*I (شرکت سیناژن) و *Tru*9I

(ایزو شیزومر *Mse*I از شرکت Promega) به منظور برش DNA ژنومی استفاده شد. واکنش برش در دمای ۳۷ درجه سلسیوس داخل انکوباتور و به مدت ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. سپس واکنش اتصال آداپتور (جدول ۲) با همان آنزیم های برشی و طبق روش *وس* و همکاران (۱۹۹۵) صورت گرفت.

جدول ۲- توالی آداپتور های به کار رفته در این تحقیق (*وس* و همکاران ۱۹۹۵)
Table 2. AFLP adapter primers sequences used in this study

5´-GACGATGAGTCCTGAG-3´	Forward Tru9I
5´-TACTCAGGACTCAT-3´	Reverse Tru9I
5´-GACTGCGTAGGTGCA-3´	Forward PstI
5´-CCTACGCAGTCTACGAG-3´	Reverse PstI

قبل از شروع مرحله تکثیر پیش انتخابی نمونه ها به نسبت ۱:۵ رقیق گردیدند. در این مرحلـه از آغازگر های PstI و Tru9I (جدول ۳) استفـاده شد. برنامه ترموسایکلر برای تکثیر پیش انتخابی با انجام تغییرات و اصلاحات جزیی طبق روش *وس* و همکاران (۱۹۹۵) شامل ۲۶ چرخه بود. مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس (یک دقیقه) و بسط نهایی به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. برای مرحله تکثیر انتخابی ابتدا محصول تکثیر پیش انتخابی به نسبت ۱:۵ رقیق شد، برنامه ترموسایکلر برای این مرحله شامل سه قسمت به شرح ذیل بود:

- قسمت اول (واسرشت اولیه) شامل یک چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس (۶۰ ثانیه)،
- قسمت دوم شامل ۱۲ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سلسیوس (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سلسیوس (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سلسیوس از دمای اتصال کاهش می یابد،
- قسمت سوم شامل ۲۳ چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سلسیوس (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سلسیوس (۶۰ ثانیه)، قسمت آخر (بسط نهایی) شامل یک چرخه در ۷۲ درجه سلسیوس (۳۰۰ ثانیه). مرحله تکثیر انتخابی با استفاده از ترکیب آغازگر های مختلف انجام شد (جدول ۳).

پس از پایان مرحله تکثیر انتخابی، از آنجا که تعداد باند ها زیاد و فواصل آن ها کم است، به منظور مشاهده و تفکیک دقیق تر باند ها از ژل پلی آکریل آمید توالی یاب استفاده شد. ژل مورد استفاده آکریل آمید ۶ درصد در ۷ مولار اوره و در بافر TBE بود. فرآورده های حاصل از تکثیر انتخابی با حجمی مساوی (۱۵ میکرولیتر) از بافر نمونه گذاری فرمامید مخلوط

جدول ۳- ترکیب آغازگر های استفاده شده در AFLP قارچ های اندوفیت

Table 3. AFLP primer combinations used in this study

ردیف No.	ترکیب آغازگر Primer Combinations
1	P[a](AAA)-M[b](CCG[c])
2	P(AAA)-M(TG)
3	P(AAA)-M(TA)
4	P(AGC)-M(TC)
5	P(AAA)-M(CG)
6	P(AAA)-M(CT)
7	P(AGC)-M(AG)
8	P(AGC)-M(TG)

a. آغازگر مکمل توالی آداپتور PstI، 5′-GACTGCGTAGGTGCA- 3′

b. آغازگر مکمل توالی آداپتور Tru9I، 5′-GATGAGTCCTGAGTAA- 3′

c. نوکلئوتید های انتخابی اضافه شده به انتهای ′۳ آغازگر ها

و پس از ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس سریعا روی یخ قرار داده شد. الکتروفورز نمونه ها به مـدت یک ساعت و ۳۰ دقیـقه و در توان ثابت ۱۰۰ وات و دمای ثابت ۵۰ درجه سلسیوس صورت پذیرفت. پس از اتمام زمان الکتروفورز و جدا سازی شیشه ها، شیشه متصل به ژل در اسید استیک ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه برای تثبیت ژل قرار داده شد. ادامه مراحل رنگ آمیزی شامل مراحل زیر بود:

سه مرتبه آبشویی با آب مقطر دو بار تقطیر شده هر بار به مدت دو دقیقه، قرار دادن در محلول رنگ‌آمیزی، حاوی ۰/۱ درصد نیترات نقره و به ازای هر ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول ۱/۵ میلی لیتر فرم‌آلدیید ۳۷ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه، آبشویی با آب مقطر دو بار تقطیر سرد به مدت ۵ ثانیه، قرار دادن در محلول ظهور که به ازای هر ۱۰۰۰ میلی لیتر محلول شامل: ۳۰ گرم کربنات سدیم (بدون آب)، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر تیوسولفات سدیم، ۱/۵ میلی لیتر فرم آلدیید ۳۷ درصد می باشد که بسته به قدرت واکنش ۱۰-۱ دقیقه زمان نیاز دارد و سپس محلول توقف که همان اسید استیک ۱۰ درصد می باشد و آبشویی نهایی ژل آخرین مرحله رنگ‌آمیزی است.

در تکنیک AFLP هر نوار چند شکل به عنوان یک نشانگر در نظر گرفته شد و الگوی نواری به صورت وجود نوار (۱) و عدم وجود نوار (۰) امتیاز بندی شد. امتیاز بندی نوار ها به صورت چشمی انجام گرفت. ماتریس صفر و یک حاصل از امتیازدهی نشانگر های AFLP به عنوان ورودی برای تجزیه های آماری مورد استفاده قرار گرفت. کلیه تجزیه و تحلیل های

آماری به وسیله نرم افزار NTSYS ver. 2/02 انجام شد. در این بررسی، از ضریب تشابه دایس جهت برآورد شباهت ژنتیکی و از الگوریتم UPGMA برای رسم دندروگرام استفاده شد. ضریب تشابه دایس نوار هایی را در نظر می گیرد که از یک جد مشترک به ارث می رسند.

$$GS_{DICE} = \frac{2N_{11}}{N_{11} + N_{10} + N_{01}}$$

N_{11} : وجود باند در هر دو فرد.

N_{10} و N_{01} : باند هایی که فقط در یک فرد وجود دارند.

نتیجه و بحث

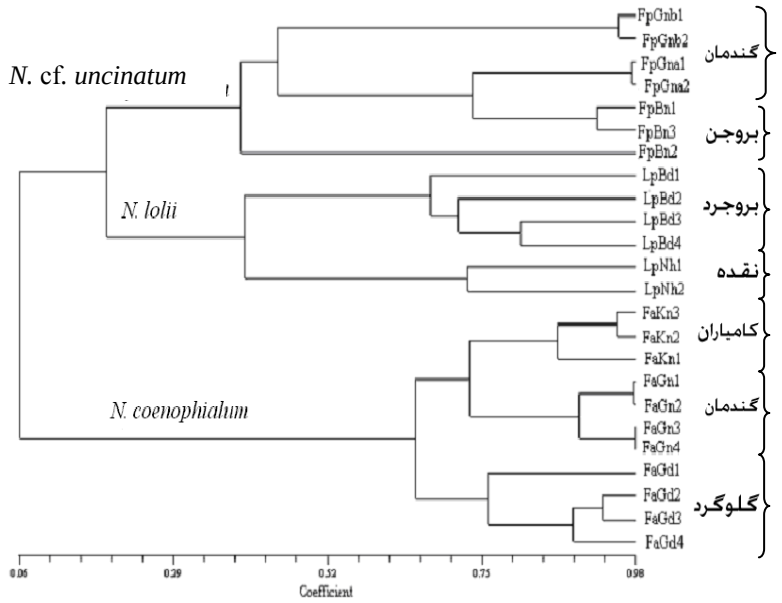
نتایج رنگ آمیزی غلاف گیاهان جمع آوری شده با استفاده از محلول رنگی رزبنگال و مشاهده زیر میکروسکوپ، حضور قارچ را در ژنوتیپ های مورد استفاده تایید نمود. میسلیوم های قارچ به رنگ صورتی در فضاهای بین سلولی به صورت مارپیچ و موازی با آوند ها مشاهده شدند. این ریسه ها دارای دیواره عرضی بوده و از سلول های گیاهی کاملا متمایز و قابل تشخیص هستند. خصوصیات قارچ های جدا سازی شده با نمونه های تشخیص داده شده توسط *دهقانپور* و همکاران (Dehghanpour *et al.* 2005) مقایسه، نامگذاری و دسته بندی شدند.

نتایج انجام PCR با جفت آغازگر اختصاصی IS1/IS3 تایید نمود که جدایه های مورد مطالعه در این پژوهش همگی از جنس *Neotyphodium* بودند. طبق نتایج *داس* و همکاران و *تسایی* و همکاران قارچ های *Neotyphodium* با این جفت آغازگر که براساس مناطق اینترون ۱ و ۳ ژن بتاتوبولین طراحی شده اند، باند ۴۴۴ جفت بازی ایجاد می کنند (Tsai *et al*. 1994, Doss *et al*. 1998).

بررسی نتایج به کارگیری هشت ترکیب آغازگر در مرحله تکثیر انتخابی روی ۲۴ نمونه قارچ جدا سازی شده از ژنوتیپ های گیاهی در این تحقیق نشان داد که از مجموع تعداد ۲۶۵ نوار مشاهده شده، ۲۴۲ نوار چند شکل و بقیه هم‌شکل بودند. میانگین تعداد نوار چند شکل هر آغازگر ۴۰ باند، که در فاصله ۷۰ تا ۵۰۰ جفت بازی پراکنده بودند. ترکیب آغازگری P(AAA)-M(TG) بیشترین چند شکلی و ترکیب آغازگری P (AAA)-M (CCG) کمترین چند شکلی را داشتند. از آنجا که ژنوم قارچ ها نسبت به ژنوم گندمیان کوچکتر است، استفاده از آغازگر ها با سه نوکلئوتید انتخابی در این تحقیق میزان باند های چند شکل را به طور قابل ملاحظه ای کاهش داد، به همین خاطر از آغازگر های Tru9I با دو نوکلئوتید انتخابی استفاده شد.

تردوی و همکاران (Tredway *et al*. 1999) با انجام AFLP روی قارچ های اندوفیت با استفاده از ۱۳ ترکیب آغازگر در کل ۹۶۳ باند مشاهده کردند که ۷۹۳ باند چند شکل قابل شناسایی بود. در تحقیق دیگر که توسط *جونگ* و همکاران (Jong *et al*. 2003) انجام شده است با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری مختلف تعداد ۸۷۹ باند چند شکل را از بین ۸۸۲ باند گزارش کردند که بیشترین میزان چند شکلی بین دو جنس *Neotyphodium* و *Epichloë* (به ترتیب ۷۲ و ۶۶ درصد کل باندهای چند شکل) بوده است.

بررسی ضرایب تشابه در این پژوهش نشان داد کمترین ضریب تشابه (۰/۰۶۳) مربوط به جدایه های *N. coenophialum* با *N.*cf. *uncinatum* و *N. lolii* بود. همان‌گونه که *جونگ* و همکاران (Jong *et al*. 2003) در مطالعه خود نشان دادند، دو گونه *N. uncinatum* و *N. lolii* فاصله ژنتیکی کمتری با یکدیگر و فاصله ژنتیکی بیشتری با *N. coenophialum* دارند، در تحقیق حاضر نیز نتایج مشابهی برای جدایه های جدا شده از میزبان های بومی ایران به دست آمد. بیشترین ضریب تشابه (۰/۹۸) مربوط به دو جدایه FaGn1 و FaGn2 و همچنین جدایه های FaGn3 و FaGn4 بود. این جدایه ها متعلق به چهار ژنوتیپ گیاهی *F. arundinacea* که همگی از ناحیه گندمان انتخاب شده اند بود و بیانگر ارتباط مستقیم احتمالی قارچ با میزبان است. دندروگرام حاصل از گروه بندی نمونه ها در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- دندروگرام ۲۴ جدایه قارچی براساس نشانگر های مولکولی AFLP.

Fig. 1. Dendrogram based on AFLP molecular markers.

دندروگرام حاصل از داده های مولکولی نشان داد که در ضریب تشابه ۰/۱۹ سه دسته متفاوت ایجاد گردید، که هر کدام از آن ها نشان دهنده گونه خاصی از جنس *Neotyphodium* بود. با توجه به این که قارچ های استخراج شده از دو جنس گیاهی فستوکا و لولیوم بودند انتظار می رفت که جدایه های قارچ نیز در دندروگرام در کمترین ضریب تشابه به دو دسته یکی قارچ های استخراج شده از جنس گیاهی *فستوکا* و دیگری جدایه های قارچی جنس *لولیوم* قرار بگیرند، ولی همان طور که در شکل مشخص است گونه *N.* cf. *uncinatum* با *N. lolii* در یک گروه قرار گرفته است، در حالی که براساس قرابت میزبانی انتظار می رفت گونه های *N.* cf. *uncinatum* و *N. coenophialum* که هر دو از فستوکا به دست آمده اند در یک گروه قرار گیرند. این تناقض را می توان احتمالا به سطوح پلوییدی میزبان ها نسبت داد. مطالعات *رو* و *اسلپر* (Xu & Sleper 1994) و *چاندراسخاران* و *توماس* (Chandrasekharan & Thomas 1971) نشان داده است که *F. arundinacea* هگزاپلویید (۴۲=۶x=۲n) از هیبریداسیون بین گونه تتراپلویید *F. arundinacea* subsp. *fenus* Lag. (۲۸=۴x=۲n) و گونه دیپلویید *F. pratensis* (۱۴=۲x=۲n) ایجاد شده است. از آنجایی که سطوح پلوییدی هر دو میزبان قارچ های *N. lolii* و *N.* cf. *uncinatum* دیپلویید و سطح پلوییدی میزبان *N. coenophialum* هگزاپلویید می باشد. *کراون* (Craven 2003) احتمال داده است که تعداد دسته های کروموزومی میزبان بر روند تکاملی و تنوع ژنتیکی قارچ مؤثر است. از این رو در مطالعه حاضر قارچ های *N. lolii* و *N.* cf. *uncinatum* که میزبان های گیاهی آن ها دیپلویید هستند در یک دسته و *N. coenophialum* که میزبان آن ها هگزاپلویید می باشد در دسته‌ای مجزا قرار گرفتند.

دسته‌بندی قارچ ها در داخل توده ها نیز کاملا آینه میزبان هایشان است. در واقع براساس منشا جغرافیایی متفاوت میزبان گیاهی، در داخل توده ها، قارچ ها نیز از هم تفکیک شده اند. در دسته اول یعنی جدایه های *N.* cf. *uncinatum* در خط ضریب تشابه ۰/۴، جدایه ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند و جدایه FpBn2 از سایر جدایه های هم گروه خود مجزا بود. با توجه به این که *Neotyphodium* بودن این جدایه با انجام واکنش PCR با آغازگر های اختصاصی IS1 و IS3 تایید شده بود، این جدایه ممکن است از لحاظ تکاملی با سایر جدایه های هم گروه خود متفاوت باشد همان گونه که در تحقیقی که *تردوی* و همکاران (Tredway *et al.* 1999) انجام دادند، برخی از جدایه ها به طور کامل از گروه خود دور افتاده بودند. *شاردل* و همکاران (Schardl *et al.* 1994) نشان دادند که فرآیند هایی همچون هیبریداسیون بین تیپ جنسی و تیپ غیرجنسی قارچ های اندوفیت منجر به بروز تفاوت هایی در نحوه گروه‌بندی نوع غیرجنسی نسبت به سایر هم‌گروهان خود می شود. همچنین، عواملی مثل نوترکیبی و یا موتاسیون نیز می تواند این نحوه گروه بندی را توجیه نماید.

در دسته دوم دندروگرام حاصل از گروه بندی نمونه های قارچی (شکل ۱)، جدایه های *N. lolii* به طور کامل براساس منشا جغرافیایی تفکیک شدند و هیچ روند دور از انتظاری مشاهده نشد. گزارش های *چونگ* و همکاران (Chunge *et al*. 1997)، *تردوی* و همکاران (Tredway *et al*. 1999)، *جونگ* و همکاران (Jong *et al*. 2003) و *پیانو* و همکاران (Piano *et al*. 2005) گروه بندی قارچ ها براساس منشا جغرافیایی میزبان را نیز تایید می کند.

دسته سوم جدایه های دندروگرام (شکل ۱) متعلق به قارچ های *N. coenophialum* است. داخل این دسته نیز در ضریب تشابه ۰/۷۵ سه گروه براساس منشا جغرافیایی میزبان از یکدیگر تفکیک شدند. در این گروه‌بندی جدایه FaGd1 تا حدودی از سایر هم‌گروهان خود فاصله گرفت ولی با این وجود تفاوت بیشتری با جدایه های سایر مناطق جغرافیایی در دسته سوم داشت.

از آنجایی که بیشترین بررسی ها روی تنوع ژنتیکی قارچ ها و به طور خاص قارچ های اندوفیت براساس تنوع مورفولوژیک میان جدایه های مختلف، همچون خصوصیات پرگنه، شکل و رنگ آن، شکل حاشیه پرگنه، مسطح یا برآمده بودن پرگنه، هاله دار یا بدون هاله بودن آن، وضعیت میسلیوم های هوایی، وضعیت چین خوردگی پرگنه های مختلف طول کنیدیوم و یا تنوع آیزوزایم ها استوار بود، در این تحقیق تنوع میان قارچ های اندوفیت گندمیان ایرانی براساس تکنیک کارآمد و تکرار پذیر AFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده با تنوع ژنتیکی به دست آمده توسط داده های مورفولوژیک (Ganjali *et al*. 2004, Khayyam Nekouei *et al.* 2001, Dehghanpour *et al*. 2005) به مقدار زیاد همخوانی دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از خانم مهندس سعیده دهقانپور به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه های شناسایی شده قارچ های اندوفیت سپاسگزاری می نمایند و همچنین از آقایان دکتر محمد مهدی مجیدی، مهندس محمدرضا سبزعلیان و خانم مهندس محبوبه امیری‌پور به پاس زحمت ها و مشورت های بیدریغشان تقدیر و تشکر می نمایند.

منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سمیه کریمی، دکتر آقا فخر میرلوحی، دکتر بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی و دکتر بهرام شریف نبی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

GENETIC DIVERSITY OF *NEOTYPHODIUM* FUNGAL ENDOPHYTES IN THREE IRANIAN GRASS SPECIES USING AFLP MOLECULAR MARKERS

S. KARIMI, A.F. MIRLOHI, B.E. SAYED TABATABAEI and B. SHARIFNABI
College of Agriculture, Isfahan University of Technology

Received: 21.11.2008 Accepted: 13.05.2009

Genetic diversity of fungal endophytes, *Neotyphodium* species, was studied in grasses *Festuca arundinacea*, *F. pratensis* and *Lolium perenne* using AFLP markers. Fungi were isolated from the host leaf sheaths and *Neotyphodium* species were selected based on morphological characteristics. To confirm identity of selected fungi belonging to the genus *Neotyphodium*, polymerase chain reaction was performed using specific primers. AFLP with eight primer combinations was conducted to assess genetic variation for endophyte isolates. Cluster analysis based on AFLP data placed isolates into three separate groups according to their host species. In addition, similarity coefficient indicated the genetic distance between *N. lolii* from *Lolium perenne* and *N.* cf. *uncinatum* from *Festuca pratensis* was smaller than those of *N. coenophialum* which was isolated from *F. arundinacea*. Host ploidy level and its effect on co-evolution of host-symbiont may justify the higher similarity of *N. lolii* and *N.* cf. *uncinatum*.

Key words: Grass, Endophyte, *Neotyphodium*, *Festuca*, Symbiosis, AFLP

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

Figures and tables are given in the Persian text.

References

BUMERL, J. and MIKA, V. 1991. Infection of meadow fescue and *Festuca arundinacea* by the fungus *Acremonium coenophialum*: The effect on seed yield and quality. Scientific studies, Oseva, Breeding Institute for Fodder Plants, Troubsko 187-191.

CHANDRASEKHARAN, P. and THOMAS, H. 1971. Studies in *Festuca* 5. Cytogenetic relationships between species of *Bovinae* and *Scariosae*. Z. Pflzucht. 65: 345.

CHRISTENSEN, M.J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D.D. and TAPPER, B.A. 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*), and perennial ryegrass (*Lolium perenne*). Mycol. Res. 97: 1083-1092.

CHUNGE, K.R., HOLLIN, W., SIEGEL, M.R. and SCHARDL, C.L. 1997. Genetic of host specificity in *Epichloë typhina*. Phytopathology 87: 599-605.

CRAVEN, K.D. 2003. Coevolution and genetic diversity in grass-endophyte symbioses. Agriculture Ph.D. thesis, University of Kentucky.

DEHGHANPOUR FARASHAH, S., SHARIFNABI, B. and MIRLOHI, A.F. 2005. Endophytic species of *Neotyphodium* on some Gramineous species in Iran. Rostaniha 6: 131-150 (in Persian with English summery).

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

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

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

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: 37-51 (in Persian with English summary).

GLENN, A.E., BACON, C.W., PRICE, R. and HANLIN, R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and taxonomic implication. Mycologia 88: 369-383.

GROPPE, K. and BOLLER, T. 1997. PCR assay based on a microsatellite-containing locus for detection and quantification of *Epichloë* endophytes in grass tissue. Appl. Environ. Microbiol. 63: 1543-1550.

JONG VAN ZIJLL DE, E., GUTHRIDGE, K.M., SPANGENBERG, G.C. and FORSTER, J.W. 2003. Development and characterization of EST-derived simple sequence repeat (SSR) markers for pasture grass endophyte. Genome 46: 277-290.

KHAYYAM NEKOUEI, M. MIRLOHI, A.F., NADERI SAHAB, M., MEON, S., MANAF ALI, A. and NAPIS, S. 2001. Prevalence and viability assessment of endophytic fungi in Iranian tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Asia Pacific J. Mol. Biol. Biotech. 9: 60-66.

LEUCHTMANN, A. and CLAY, K. 1990. Isozyme variation in the *Acremonium*/*Epichloë* fungal endophyte complex. Phytopathology 80: 1133-1139.

MARSCHALL, D., TUNALI, B. and NELSON, L.R. 1999. Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. Crop Sci. 39: 1507-1512.

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

MOON, C.D., TAPPER, B.A. and SCOTT, B. 1998. Identification of *Epichloë* endophytes in planta by a microsatellite based PCR fingerprinting assay with automated analysis. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1263-1279.

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

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).

PIANO, E., BERTOLI, F.B., ROMANI, M., TAVA, A., RICCIONI, L., VALVASSORI, M., CARRONI, A.M. and PECETTI, L. 2005. Specificity of host-endophyte association in tall fescue population from Sardinia Italy. Crop Sci. 45: 1456-1463.

SAHA, D.C., JAHNSON, M.A. and JAHNSON-CICALESE, J.M. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78: 237-239.

SCHARDL, C.L., LEUCHTMANN, A., TSAI, H-F., COLLETT, M.A., WATT, D.M. and SCOTT, D.B. 1994. Origin of a fungal symbiont of perennial ryegrass by interspecific hybridization of a mutualist with the ryegrass choke pathogen, *Epichloë typhina*. Genetics 136: 1307-1317.

TREDWAY, L.P., WHITE, J.F. Jr., GAUT, B.S., REDDY, P.V., RICHARDSON, M.D. and CLARKE, B.B. 1999. Phylogenetic relationship within and between *Epichloë* and *Neotyphodium* endophytes as estimated by AFLP markers and rDNA sequences. Mycol. Res. 103: 1593-1603.

TSAI, H.F., LIU, J.S., STABEN, C., CHRISTENSEN, M.J., LATCH, G.C.M., SIEGEL, M.R. and SCHARDL, C.L. 1994. Evolutionary diversification of fungal endophytes of tall fescue grasses by hybridization with *Epichloë* species. Evolution 91: 2542-2546.

VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

XU, W.W. and SLEPER, D.A. 1994. Phylogeny of tall fescue and related species using RFLPs. Theor. Appl. Gen. 88: 685-690.

Address of the authors: S. KARIMI, Former graduate student of Plant Breeding, Dr. A.F. MIRLOHI, Dr. B.E. SAYED TABATABAEI and Dr. B. SHARIFNABI, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan 8415683111, Iran.