

کاربرد مقایسه‌ای الگوهای PCR-RFLP مناطق ITS و ژن 5.8 S

در تاکسونومی قارچ‌های اندوفیت *Neotyphodium**

Application of 5.8 S gene and ITS, PCR-RFLP patterns in taxonomy of
Neotyphodium endophytic fungi

سعیده دهقانپور فراشاه، بهرام شریف‌نبی** و آقافخر میرلوحی

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت: ۱۳۸۴/۷/۳

پذیرش: ۱۳۸۵/۲/۱۹

چکیده

در این پژوهش قارچ‌های اندوفیت از غلاف برگ و بذرها میزبان‌های گیاهی *Bromus tomentellus*، *Festuca ovina*، *F. pratensis*، *F. arundinacea*، *Lolium prene* و *Melica persica* جداسازی گردید. پس از استخراج DNA ژنومی این جدایه‌ها به منظور تایید حضور گونه‌های اندوفیت از سه جفت آغازگر ITS₁/ITS₄، ITS₁/IS₃ و 11₁/11₂ استفاده گردید. نتایج حاصل از PCR با این سه جفت آغازگر نشان داد که اکثر جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش از گروه قارچ‌های اندوفیت و از جنس *Neotyphodium*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی آقایان دکتر بهرام شریف‌نبی و دکتر آقافخر میرلوحی ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان
** مسئول مکاتبه

و جدایه‌های مربوط به *Festuca arundinacea* متعلق به گونه *N. coenophialum* بودند. برای تکثیر نواحی ITS₁ و ITS₂ و ژن S 5.8 از آغازگرهای ITS₁ و ITS₄ استفاده شد و سپس برش آنزیمی به وسیله آنزیم‌های محدودگر *Sau3AI* و *CfoI* انجام گرفت. نتایج PCR-RFLP نشان داد که جز در چند مورد، نتایج حاصل از هضم آنزیمی با نتایج حاصل از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و انجام واکنش PCR با سه جفت آغازگر مذکور همخوانی داشت.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های اندوفیت، *Neotyphodium*، RFLP-PCR، تاکسونومی

مقدمه

قارچ‌های اندوفیت، گروهی از قارچ‌های تیره Clavicipitaceae هستند که به صورت غالب در گیاهان تیره گندمیان وجود دارند و شامل گونه‌های دو جنس *Epichloë* و *Balansia* می‌باشند. گونه‌هایی که در جنس *Balansia* طبقه‌بندی می‌شوند دارای مرحله کنیدیومی جنس *Ephelis* هستند و گونه‌های جنس *Epichloë* دارای مرحله کنیدیومی *Neotyphodium* می‌باشند (Brem & Leuchtman 2003, Bacon *et al.* 1997, White 1994).

قارچ‌های اندوفیت همزیست با گیاهان به صورت بین‌سلولی در برگ‌ها، ساقه، مریستم‌های جوانه و بذرها میزبان رشد می‌کنند و هیچ گونه علائم بیماری در میزبان ایجاد نمی‌کنند (Leuchtman & Schardl 1998). ریشه‌ها به ندرت در آوندهای چوبی و آبکش یافت می‌شوند. تنوع زیادی در میان اندوفیت‌های گیاهان علفی از نظر تولید آکالوئید وجود دارد که باعث ایجاد اختلال در سلامتی حیوانات تغذیه کننده می‌شود و ممکن است باعث مقاومت این گیاهان به حشرات آفت شود. تولید متابولیت‌هایی نظیر آکالوئیدهای پرامین و لولین باعث حفاظت میزبان علیه آفات و آکالوئیدهایی نظیر لولیترم B و ارگووالین باعث مسمومیت حیوانات تغذیه کننده می‌شوند (Leuchtman, & Schardl 1998, Bacon & White 1994, Cunningham 1949). اندوفیت‌ها باعث افزایش فتوسنتز و رشد ریشه گیاه میزبان می‌شوند (Belesky & Fedders 1995) و عملکرد گیاهان میزبان را افزایش می‌دهند (Marshall *et al.* 1999). گیاهان آلوده به اندوفیت، عملکرد خوبی در شرایط کمبود ترکیبات نیتروژن نسبت به گیاهان غیرآلوده دارند (Hiatt *et al.* 1997).

از روش‌های سرولوژیکی الایزا برای تشخیص قارچ‌های اندوفیت در فسکیوی بلند و رای‌گراس (Saha *et al.* 1988) و از آنتی‌بادی‌های منوکلونال برای تعیین گونه *N. coenophialum* (Morgan-Jones & Gams) Glenn, Bacon & Hanlin استفاده شده است.

تحقیقات نشان داده است که آنتی‌بادی‌های منوکلونال بیشتر از آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال قابلیت تفکیک اندوفیت‌ها را داشتند (Hiatt *et al.* 1997). تجزیه و تحلیل ایزوزایمی، تنوع ژنتیکی زیادی را در بین اندوفیت‌های فسکیوی بلند و رای گراس نشان داد (Leuchtmann & Scharl 1994). داس و ولتی (Doss & Welty 1995) طی انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای 11_I / 11_{II}، گیاهان آلوده به *Acremonium coenophialum* Morgan-Jones & Gams را از گیاهان غیرآلوده به این قارچ تشخیص دادند. آن‌ها همچنین با جفت آغازگر IS_I / IS_{III} و تکثیر قطعه ۴۴۴ جفت باز، قارچ *Neotyphodium* را از گیاهان آلوده به این قارچ ردیابی کردند (Doss *et al.* 1998). از آغازگرهای ITS₁ / ITS₄ و مقایسه الگوهای PCR-RFLP این مناطق برای مقایسه گونه‌های *A. strictum* Gams و *A. kiliense* Grutz *A. obclavatum* Gams (Borazjani *et al.* 1998). نشانگرهایی نظیر AFLP و SSR برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی در میان قارچ‌های اندوفیت و ارزیابی ارتباط بین تنوع اندوفیت و تغییرات خصوصیات زراعی میزبان نیز استفاده گردیده است (Van Zijl de Jong *et al.* 2003). پژوهش‌های فیلوژنتیک بر اساس توالی ژن‌های بتاتوبولین و مناطق ITS در rDNA نشان می‌دهد که گونه‌های غیرجنسی *Neotyphodium* از گونه‌های جنسی *Epichloë* مشتق شده‌اند. این یافته‌ها با اطلاعات مولکولی به دست آمده از نشانگرهای ایزوزایمی و ریز ماهواره‌ها نیز تایید شده است (Brem & Leuchtmann 2003). گنجعلی و همکاران (Ganjali *et al.* 2004) تنوع ژنتیکی قارچ‌های اندوفیت همزیست با چند میزبان تیره گندمیان جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران را با استفاده از RAPD-PCR مورد مطالعه قرار دادند. دهقانپور و همکاران (Dehghanpour *et al.* 2005) در تحقیقات خود بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی جنس *Neotyphodium* را برای میزبان‌های *F. pratensis* Hudson، *F. arundinacea* Schreb، *L. prene* L. و *M. persica* Hunth، *B. tomentellus* Boiss، *F. ovina* L. گونه *N. lolii* (Latch, Christensen & Samuels) Glenn, Bacon & Hanlin برای *L. prene* L. گونه *N. coenophialum* برای گیاه *F. arundinacea* گونه *N. festucae* Leuchtmann, Scharl & Siegel از *F. ovina* و گونه *N. cf. bromicola* Leuchtmann & Scharl برای *B. tomentellus* تشخیص دادند. در پژوهش حاضر با استفاده از روش PCR-RFLP به شناسایی و مقایسه گونه‌های قارچ‌های اندوفیت *Neotyphodium* جدا شده از میزبان‌های علفی مختلف جمع‌آوری شده از سراسر ایران پرداخته شده است.

روش بررسی

۱- جداسازی قارچ‌های اندوفیت از گیاهان آلوده

گیاهان آلوده به قارچ‌های اندوفیت شامل گونه‌های *Festuca arundinacea*، *F. ovina*، *F. pratensis*، *Bromus tomentellus* و *Melica persica* از سراسر ایران جمع‌آوری گردید. در جدول ۱ جدایه‌های به کار رفته در این تحقیق آورده شده است.

جدول ۱- فهرست جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. List of isolates used in this study

ردیف No.	کد جدایه Isolate code	نام میزبان Host species	محل جمع‌آوری Location
۱	FaAh	<i>Festuca arundinacea</i>	اصفهان - ایبانه
۲	FaEn	<i>F. arundinacea</i>	اصفهان - اسفرجان
۳	FaHn	<i>F. arundinacea</i>	اصفهان - هونجان
۴	FaKh	<i>F. arundinacea</i>	اصفهان - روستای کشه
۵	FaKn ₁	<i>F. arundinacea</i>	کردستان کامیاران - ۱
۶	FaKn ₂	<i>F. arundinacea</i>	کردستان کامیاران - ۲
۷	FaFn ₁	<i>F. arundinacea</i>	خراسان - فریمان - ۱
۸	FaFn ₂	<i>F. arundinacea</i>	خراسان - فریمان - ۲
۹	FaFn ₃	<i>F. arundinacea</i>	خراسان - فریمان - ۳
۱۰	FaYj	<i>F. arundinacea</i>	کهگیلویه و بویراحمد - یاسوج
۱۱	FoGn	<i>F. ovina</i>	گلستان - گرگان
۱۲	FoFn	<i>F. ovina</i>	خراسان - فریمان
۱۳	FoTn	<i>F. ovina</i>	تهران - نیاوران
۱۴	FpBn	<i>F. pratensis</i>	چهارمحال و بختیاری - بروجن
۱۵	FpEn	<i>F. pratensis</i>	اصفهان - ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه
۱۶	FpKn	<i>F. pratensis</i>	کردستان کامیاران
۱۷	BtBi	<i>Bromus tomentellus</i>	اصفهان - بانه غربی
۱۸	BtBn	<i>B. tomentellus</i>	چهارمحال و بختیاری - بروجن
۱۹	BtChn	<i>B. tomentellus</i>	اصفهان - چادگان
۲۰	BtFd	<i>B. tomentellus</i>	اصفهان - فخرآباد

Table 1. (contd.)

جدول ۱ (ادامه)

۲۱	BtFn	<i>B. tomentellus</i>	اصفهان - فریدن
۲۲	BtGh	<i>B. tomentellus.</i>	اصفهان - قرق موته
۲۳	BtHi	<i>B. tomentellus</i>	چهارمحال و بختیاری - حمزعلی
۲۴	BtKn	<i>B. tomentellus</i>	اصفهان - کنده قبرستان
۲۵	BtSm	<i>B. tomentellus</i>	اصفهان - سمیرم
۲۶	BtShd	<i>B. tomentellus</i>	چهارمحال و بختیاری - شهرکرد
۲۷	MpEn	<i>Melica persica</i>	اصفهان - اسفرجان
۲۸	MpFn	<i>M. persica</i>	چهارمحال و بختیاری - فارسان
۲۹	MpHi	<i>M. persica</i>	چهارمحال و بختیاری - حمزعلی
۳۰	MpKhr ₁	<i>M. persica</i>	اصفهان - خمینی شهر
۳۱	MpKhr ₂	<i>M. persica</i>	اصفهان - خمینی شهر
۳۲	LpNh	<i>Lolium prene</i>	آذربایجان غربی - نقده
۳۳	LpYd	<i>L. prene</i>	اصفهان - یحیی آباد

برای ضدعفونی بذرها و غلاف گیاهان آلوده از روش به کار رفته توسط گنجعلی و همکاران (۲۰۰۴) استفاده شد. پس از جداسازی قارچ‌ها از بذرها و غلاف برگ، از دو روش تک اسپور و نوک ریشه برای خالص‌سازی آن‌ها استفاده گردید. برای تولید انبوه میسلیوم جهت استخراج DNA قطعه کوچکی از پرگنه قارچ به ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت‌های Potato (PSB) و Sucrose Broth (MYP) و Malt Yeast Peptone در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۰۰ دور در دقیقه اضافه گردید.

۲- شناسایی قارچ‌های اندوفیت به وسیله PCR

در این مطالعه استخراج DNA ژنومی با روش لیو و همکاران (Liu et al. 1995) انجام شد. شناسایی قارچ‌های اندوفیت، با جفت آغازگرهای عمومی (5'-TCCgTAggTgAACCTgCgg- 3') و ITS₄ (5'-TCCTCCgCTTATTgATATgC-3') (White 1993) صورت گرفت. آغازگرهای اختصاصی IS₁ (5'-gTCTCATCTCCggggCggTAT- 3') و IS₃ (5'-ggTgTTgAgCCCCCCTgATTT- 3') (Doss et al. 1998) و 11₁ (5'-TCATACCggCTAACCggCAAT-3') و 11₂ (5'-TgTTACAggATTggTAgAggC- 3') (Doss & Welty 1995) نیز به کار رفتند. مواد لازم و مقدار آن برای تهیه محلول پایه شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر

PCR (X 10) با ۱۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط ۱۰ میلی‌مولار dNTPs (Roche Co., Cat No. 1581295)، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از جفت آغازگرها با غلظت ۲۰ میکرومولار، ۰/۱۵ میکرولیتر آنزیم *Taq* DNA (Roche Co., Cat No. 92767332) پلی‌مراز ۵ U/μl و ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار (Roche Co., Cat No. 9217982) بود که حجم نهایی به ۲۱ میکرولیتر رسانده شد و به هر نمونه چهار میکرولیتر DNA جدایه مورد نظر اضافه گردید. زمان و دمای لازم برای سه مرحله مختلف PCR با جفت آغازگرهای مختلف در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲- شرایط دمایی PCR برای آغازگرهای IS_1/IS_3 و $11_1/11_2$ ، ITS_1/ITS_4
Table 2. PCR conditions for ITS_1/ITS_4 , $11_1/11_2$ and IS_1/IS_3 primer pairs

تعداد چرخه No. of Cycles	مراحل انجام شده Step	زمان Time	درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temp. (° C)
۱ چرخه	واسرشت (denaturation)	۲ دقیقه (IS_1/IS_3 , ITS_1/ITS_4) ۱ دقیقه ($11_1/11_2$)	۹۴
۳۰ چرخه	واسرشت	۱ دقیقه	۹۴
	اتصال (annealing)	۱ دقیقه (ITS_1/ITS_4) ۱ دقیقه ($11_1/11_2$) ۱ دقیقه (IS_1/IS_3)	۵۵ ۶۸ ۶۲
	گسترش (extension)	۲ دقیقه	۷۲
۱ چرخه	گسترش نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

۳- الکتروفورز محصول PCR

برای الکتروفورز هر یک از نمونه‌ها، پنج میکرولیتر از محصول PCR اولیه پس از اختلاط با دو میکرولیتر بافر بارگذاری (۴۰٪ ساکاروز، ۲۵٪ برومو فنل بلو، ۲۵٪ زایلن سیانول و ۶۷ میلی‌مولار EDTA) روی محیط ژل آگاروز ۱٪/۲٪ (Roche Co., Cat No. 1388983) در بافر 1X TBE با ولتاژ ثابت ۶۰ ولت الکتروفورز شد. نشانگر *Hind* III-*Eco*RI (Roche, M III) و نشانگر ۱۰۰ bp Ladder (Roche Co., Cat No. 1721933)، به عنوان

مقیاس اندازه‌گیری قطعات استفاده گردید. پس از حدود ۲/۵ ساعت جریان برق قطع شده و ژل برای رنگ‌آمیزی ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر قرار گرفت. پس از شستشوی ژل با آب معمولی، عکس‌برداری از ژل با دستگاه Gel document vilber Lourmat TCP-20-M انجام شد.

۴- برش آنزیمی محصول تکثیر یافته PCR

برای تعیین شباهت‌ها و یا تفاوت‌های احتمالی DNA در جدایه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت، تعداد ۲۲ جدایه (*BtHi*, *BtShd*, *BtBn*, *FaFn₁*, *FaFn₃*, *FaKh*, *FaAh*, *FaEn*), *FoTn*, *FaYj*, *FaHn*, *MpKhr₂*, *LpNh*, *FpEn*, *FpKn*, *MpKhr₁*, *FoGN*, *FaKn₂*, *FaKn₁*, *BtGh*, *BtBi*, *FpBn*) مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور پس از انجام PCR اولیه با آغازگرهای ITS₁/ITS₄، پنج میکرولیتر از محصول به دست آمده با آنزیم‌های برشی مخلوط و برش آنزیمی انجام شد. برای هضم آنزیمی پنج میکرولیتر DNA تکثیر یافته با PCR، ۱/۵ میکرولیتر بافر (X ۱۰)، یک میکرولیتر آنزیم برشی و ۷/۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر سترون بود، استفاده شد.

شرایط برش آنزیمی برای مخلوط واکنش، برای هر دو آنزیم *Sau3AI* و *CfoI* سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. ردیابی قطعات حاصل از هضم آنزیمی، با استفاده از ژل پلی‌آکریل‌آمید توالی‌یاب انجام شد.

فراورده‌های حاصل از PCR-RFLP با حجمی مساوی (۱۵ میکرولیتر) با بافر نمونه‌گذاری مخلوط و پس از پنج دقیقه استقرار در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سریعاً روی یخ قرار داده شدند و از هر نمونه به میزان ۱۰ میکرولیتر در ژل ۶٪ پلی‌آکریل‌آمید واسرشت قرار داده شد. در این تحقیق از دستگاه ژل توالی‌یاب (Sequencing) Biometra استفاده گردید. ولتاژ ثابت آزمایش ۲۰۰ ولت، زمان ۱۱۰ دقیقه و دمای ژل در طول الکتروفورز ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. قبل از الکتروفورز اصلی، الکتروفورز مقدماتی (بدون نمونه‌گذاری) به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط فوق صورت گرفت. اجزاء ۵۰ میلی لیتر محلول ژل ۶٪ واسرشت حاوی ۲۱ گرم اوره، ۱۰ میلی لیتر TBE ۵ برابر و ۷/۵ میلی لیتر محلول آکریل‌آمید ۴۰٪ است که حجم نهایی با آب مقطر به ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. برای تهیه ژل ۳۵۰ میکرولیتر آمونیوم پرسولفات همراه با ۳۰ میکرولیتر TEMED به محلول فوق اضافه و بلافاصله در فضای بین دو شیشه تزریق گردید.

برای کار با ژل توالی‌یاب روی یکی از شیشه‌ها که اندکی از دیگری بزرگتر است محلول بایندسیلن (۱/۷ میلی لیتر اتانل ۹۶ درجه، ۱۰/۸ میکرولیتر اسید استیک ۱۰۰ درصد و چهار میکرولیتر بایندسیلن) به طور یکنواخت پخش گردید تا ژل منعقد شده به آن بچسبد و برای

جلوگیری از چسبیدن ژل به شیشه دیگر روی سطح آن محلول ریپل مانند بایندسیلن به صورت یکنواخت پخش گردید.

به منظور مشاهده باندها مراحل زیر انجام شد: مرحله تثبیت به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اسید استیک ۱۰٪ صورت گرفت. در مرحله بعدی سه مرتبه و هر بار به مدت دو دقیقه آبشویی شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی (۱/۰ درصد نیترات نقره و ۳۰۰ میکرولیتر فرمالدئید) رنگ‌آمیزی انجام شد. آبشویی ژل به مدت ۱۰-۵ ثانیه با آب دوبار تقطیر، ظهور باندها به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ظهور [۶٪ کربنات سدیم بی‌آب و ۳۰۰ میکرولیتر فرمالدئید و ۴۰ میکرولیتر محلول تیوسولفات سدیم (پنج گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)] در دمای هشت درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه انجام و توقف رنگ‌آمیزی با محلول ۱۰٪ اسیداستیک در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و شستشوی نهایی با آب مقطر سرد به مدت دو دقیقه صورت گرفت.

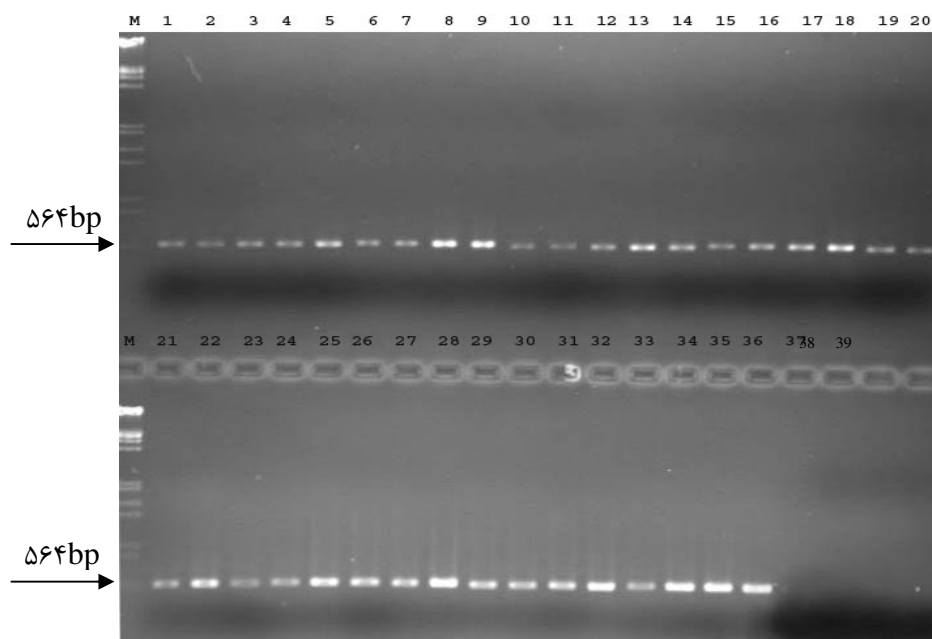
تجزیه و تحلیل داده‌های RFLP-PCR با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc Ver. 2.02 انجام شد. بدین منظور وجود و یا عدم وجود باند به ترتیب با اعداد یک و صفر مشخص گردید. پس از وارد کردن داده‌ها و تشکیل ماتریس تشابه (ستون‌ها برای جدایه‌ها و سطرها برای باندها) با استفاده از ضریب تشابه Dice و روش UPGMA دندروگرام مربوطه رسم شد. انتخاب آنزیم‌های برشی نیز بر اساس توالی ژن‌های موجود در سایت NCBI (بانک ژن) و نرم افزارهای Restriction Mapper V. III و Mapdraw صورت گرفت.

نتیجه و بحث

انجام PCR

جفت آغازگر ITS₄/ITS₁ با DNA قارچ‌های اندوفیت، قطعه‌ای به طول ۷۵۰-۵۵۰bp شامل مناطق ITS₁ و ITS₂ و ژن 5.8 S را تکثیر نمودند. استرین‌های تیپ *E. typhina*، *N. coenophialum* و *N. lolii* دریافت شده از مرکز CBS (Centraal Bureau Voor Schimmecultures) هلند به عنوان شاهد مثبت به کار رفتند و قطعات مورد نظر را تکثیر کردند. شکل ۱ الگوی بانندی در جدایه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

سپس PCR با جفت آغازگر IS_{III}/IS_I انجام شد که این آغازگرها بر اساس مناطق اینترون ۱ و ۳ ژن بتاتوبولین طراحی شده‌اند و با PCR قطعه ۴۴۴ bp را تولید کردند. تکثیر چنین قطعه‌ای اختصاص به جنس *Neotyphodium* دارد. تولید این قطعه در اکثر جدایه‌ها به جز دو جدایه FpBn و FaFn₁ با نتایج مطالعات مورفولوژیکی مبنی بر شباهت صفات مورفولوژیکی جدایه‌های

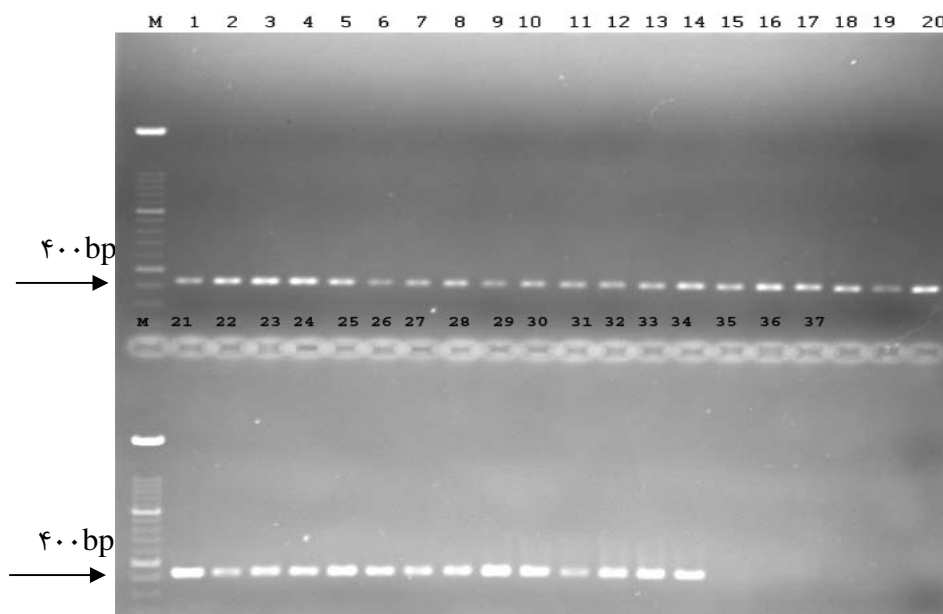


شکل ۱- ایجاد باند ۵۵۰-۷۵۰ جفت بازی در جدایه‌های بررسی شده که حاصل تکثیر نواحی ITS با آغازگرهای ITS₁ و ITS₄ هستند.

Fig. 1. A 550-750 bp fragment produced using ITS₁ / ITS₄ primers. Lanes: [1- FaAh, 2- FaEn, 3- FaHn, 4- FaKh, 5- FaKn₁, 6- FaKn₂, 7- FaFn₁, 8- FaFn₂, 9- FaFn₃, 10- FaYj, 11- FoGN, 12- FoFn, 13- FoTn, 14- FpEn, 15- FpBn, 16- FpKn, 17- BtBi, 18- BtBn, 19- BtChn, 20- BtFd, 21- BtFn, 22- BtGh, 23- BtHi₂, 24- BtKn, 25- BtSm, 26- BtShd, 27- MpEn, 28- MpFn, 29- MpHi, 30- MpKhr₁, 31- MpKhr₂, 32- LpNh, 33- LpYd, 34- *E. typhina* (positive control), 35- *N. coenophialum* (positive control), 36- *N. lolii* (positive control), 37- negative control, 38- negative control 2, 39- H₂O, M- marker III].

اندوفیت مورد استفاده در این تحقیق و با توصیف عمومی جنس *Acremonium* مطابقت داشت. در مورد جدایه‌هایی که در روی محیط کشت‌های به کار رفته در این پژوهش کنیدیوم تولید نکرده بودند، تکثیر چنین قطعه‌ای *Neotyphodium* بودن آن‌ها را نشان داد. تکثیر چنین قطعه‌ای با یافته‌های داس و همکاران (۱۹۹۸) مطابقت داشت. شاردل (Schardl 1993) نیز در پژوهش خود نشان داد که تمام قارچ‌های اندوفیت دارای ژن بتاتوبولین هستند ولی تعداد نسخه‌های این ژن در گونه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت متفاوت است. عدم تکثیر چنین قطعه‌ای توسط گنجعلی و همکاران (۲۰۰۴) نیز در جدایه‌های FaSm و FpGon گزارش شده است که در این جدایه‌ها نیز مانند جدایه‌های FpBn و FaFn₁ با جفت آغازگر ITS₁ / ITS₄ قطعه

۵۵۰-۷۵۰ bp تکثیر شد ولی جفت آغازگر IS_{III}/IS_I نتوانستند قطعه ۴۴۴ جفت باز را تکثیر نمایند. مطالعات مورفولوژیکی این دو جدایه نشان داد که این دو جدایه کاملاً با بقیه جدایه‌های اندوفیت از نظر سرعت رشد پرگنه، نحوه تولید هاگ، شکل و اندازه هاگ و وضعیت دیواره در قاعده کنیدیوفور متفاوت بودند. شکل ۲ الگوی باندهای ۴۴۴ bp در جدایه‌های مختلف را نشان می‌دهد.

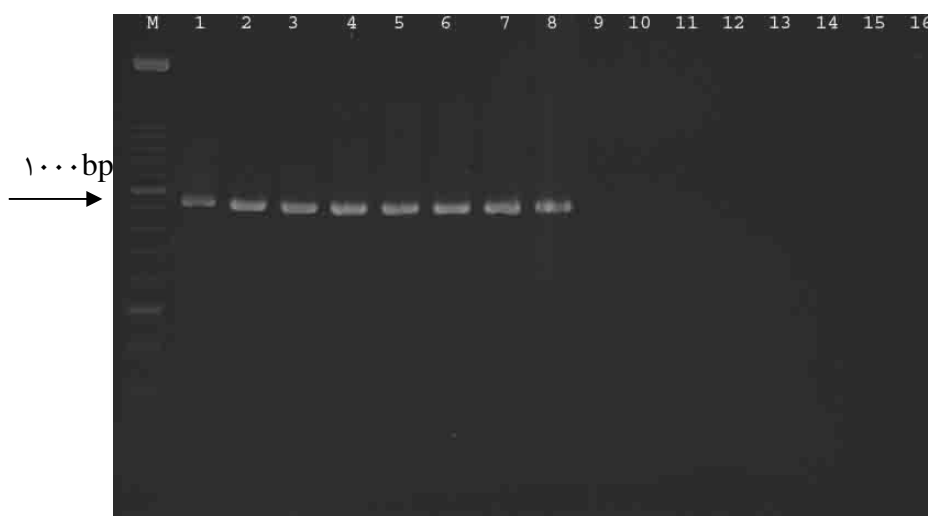


شکل ۲- ایجاد باند ۴۴۴ جفت بازی که پس از تکثیر با آغازگر IS_3/IS_1 در جدایه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت مورد مطالعه به دست آمد.

Fig. 2. A 444 bp fragment produced using IS_1 / IS_3 primers. Lanes: [1- FaAh, 2- FaEn, 3- FaHn, 4- FaKh, 5- FaKn₁, 6- FaKn₂, 7- FaFn₂, 8- FaFn₃, 9- FaYj, 10- FoFn, 11- FoGn, 12- FoTn, 13- FpEn, 14- FpKn, 15- BtBi, 16- BtBn, 17- BtChn, 18- BtFd, 19- BtFn, 20- BtGh, 21- BtHi₂, 22- BtKn, 23- BtSm, 24- BtShd, 25- MpEn, 26- MpFn, 27- MpHi, 28- MpKhr₁, 29- MpKhr₂, 30- LpNh, 31- LpYd, 32- *E. typhina* (positive control), 33- *N. coenophialum* (positive control), 34- *N. lolii* (positive control), 35- FaFn₁, 36- FpBn, 37- negative control, M- 100 bp ladder].

برای تعیین گونه *N. coenophialum* از آغازگر $11_{II}/11_I$ استفاده شد که این جفت آغازگر نیز بر اساس توالی ژن بتاتوبولین طراحی شده‌اند و در انجام PCR قطعه ۱۰۰۰ bp را تکثیر کردند. جدایه‌های FaAh, FaEn, FaHn, FAKh, FaFn₂, FaFn₃ و FaYj که متعلق به

میزبان *F. arundinacea* بودند چنین باندی را تولید نمودند. استرین تیپ *N. coenophialum* به عنوان شاهد مثبت انتخاب شد و دقیقاً چنین باندی را ایجاد کرد ولی استرین‌های تیپ *N. lolii* و *E. typhina* (Pers.) Tul. & C. Tul. چنین باندی را تولید نکردند و چنین نتایجی با یافته‌های داس و ولتی (۱۹۹۵) مطابقت داشت. در شکل ۳ الگوی باندی این آغازگر نشان داده شده است. تکثیر چنین قطعه‌ای در هفت جدایه $FaFn_2$, $FaFn_3$, $FaYj$, $FaKh$, $FaEn$, $FaHn$ و $FaAh$ ، نتایج حاصل از مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی را تایید می‌کند. این هفت جدایه در مطالعات مورفولوژیکی به استرین تیپ *N. coenophialum* بسیار شبیه بودند. بنابراین، با انجام PCR با این سه جفت آغازگر و تکثیر قطعات مورد نظر می‌توان گفت که این هفت جدایه مربوط به گونه *N. coenophialum* هستند. این یافته‌ها با یافته‌های مورگان-جونز و گمز (Morgan-Jones & Gams 1982) و لچ (Latch *et al.* 1984) مبنی بر جداسازی قارچ‌های *N. coenophialum* از میزبان *F. arundinacea* همخوانی دارد.



شکل ۳- ایجاد باند ۱۰۰۰ جفت بازی که پس از تکثیر با آغازگرهای 11_I و 11_{II} در جدایه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت مورد مطالعه به دست آمد.

Fig. 3. A 1000 bp fragment produced using $11_I/11_{II}$ primers. Lanes: [M: 100 bp ladder, 1- *FaAh*, 2- *FaEn*, 3- *FaHn*, 4- *FaKh*, 5- $FaFn_2$, 6- $FaFn_3$, 7- *FaYj*, 8- *N. coenophialum* (positive control), 9- *N. lolii*, 10- *E. typhina*, 11- $FaFn_1$, 12- *FoGn*, 13- *FpBn*, 14- *BtFn*, 15- *MpEn*, 16- H_2O].

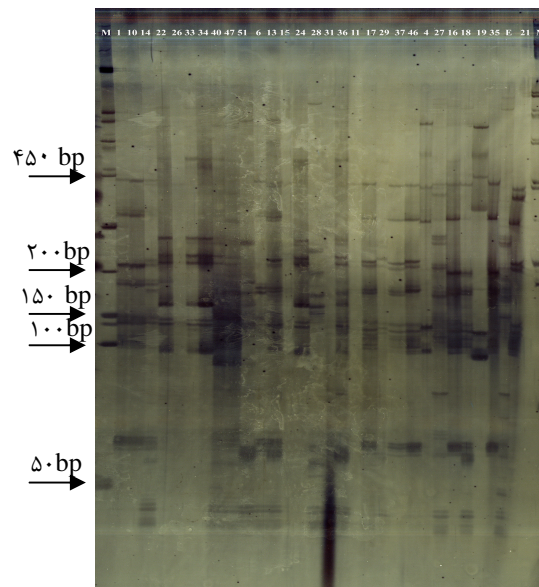
با انجام PCR با این سه جفت آغازگر مشخص شد که تمام جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش از گروه قارچ‌های اندوفیت بودند و با جفت آغازگر ITS_4/ITS_1 قطعه ۷۵۰-۵۵۰ جفت باز را تکثیر نمودند. با استفاده از جفت آغازگر IS_3/IS_1 ، تمام جدایه‌ها به غیر از دو جدایه

FpBn و FaFn₁ قطعه ۴۴۴ جفت باز را تکثیر کردند که نشان داد اغلب جدایه‌ها از جنس *Neotyphodium* هستند. استفاده از جفت آغازگر 11_{II}/11_I نیز نشان داد که جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* از گونه *N. coenophialum* می‌باشند و با استفاده از این آغازگر در هفت جدایه مذکور و استرین تیپ *N. coenophialum* قطعه ۱۰۰۰ جفت باز تکثیر شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های PCR-RFLP

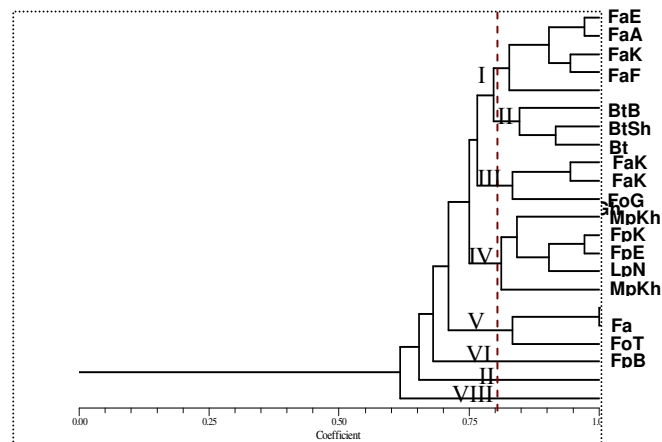
هضم آنزیمی با دو آنزیم برشی *Sau3AI* و *CfoI* روی قطعه تکثیر یافته با جفت آغازگر ITS₁/ITS₄ انجام شد. آنزیم *Sau3AI* چهار محل برش داشته و قادر به تولید پنج قطعه با اندازه‌های ۱۸۶، ۱۸۲، ۱۴۴، ۴۵ و ۲۲ جفت باز بود و آنزیم برشی *CfoI* نیز دارای سه محل برش بوده و چهار قطعه با اندازه‌های ۲۷۰، ۱۸۴، ۹۹ و ۲۶ جفت باز ایجاد کرد. تنوع در جدایه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت از نظر اندازه و تعداد قطعات مشاهده شد. در شکل ۴ قطعات برش یافته با آنزیم برشی *CfoI* روی ژل توالی‌یاب آورده شده است. دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های PCR-RFLP با دو آنزیم *CfoI* و *Sau3AI* در شکل ۵ آمده است.

اگر دندروگرام حاصل در سطح شباهت ۸۰ درصد قطع گردد، آنگاه هشت دسته مجزا دیده می‌شود که در دسته اول، جدایه‌های مربوط به میزبان *F. arundinacea* در کنار هم قرار گرفتند که نشان می‌دهد جدایه‌های مربوط به یک میزبان شباهت زیادی به یکدیگر دارند. در این گروه چهار جدایه FaAh، FaEn، FaKh و FaFn₃ در کنار هم قرار گرفتند که از نظر مورفولوژیکی بسیار شبیه به هم بودند و هر چهار جدایه علاوه بر این که با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄ و IS₁/IS₃ قطعات مورد نظر را تکثیر کردند، با جفت آغازگر 11_I/11₂ قطعه ۱۰۰۰ bp را نیز تکثیر کردند که نشان داد این جدایه‌ها از گونه *N. coenophialum* هستند. قرار گرفتن جدایه FaFn₁ در کنار سایر جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea*، نشانه شبیه بودن جدایه‌های مربوط به یک میزبان است ولی این جدایه در یک شاخه جداگانه نسبت به چهار جدایه قبلی قرار گرفت که این نتایج با نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیکی و PCR با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄، IS₁/IS₃ و 11_I/11₂ تایید شد. این جدایه فقط با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄، قطعه مربوطه را تکثیر نمود که دلیل بر اندوفیت بودن این جدایه بود ولی عدم تکثیر قطعات مورد نظر با دو جفت آغازگرهای دیگر نشان داد که ممکن است این جدایه از جنس *Neotyphodium* نباشد. برای یافتن یک نتیجه منطقی باید برش آنزیمی با تعداد بیشتری آنزیم برشی صورت گیرد. نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیک نیز نشان داد که جدایه FaFn₁ با سایر جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* متفاوت بود.



شکل ۴- الگوی باندهای قطعات برش یافته با آنزیم *CfoI* روی ژل توالی‌یاب. شماره‌های ۶، ۱۵، ۲۴، ۱۱، ۲۹، ۳۷ و ۱۸ به دلیل عدم وضوح باندها حذف گردیدند.

Fig. 4. Restriction patterns obtained using *CfoI* on sequencing gel. Lanes: [Nos 6, 15, 24, 11, 29, 37, 18 and E due to unclear bands were deleted]
[1- FaEn, 10- FaAh, 14- FaKh, 22- FaKn₁, 33- FaKn₂, 34- FaFn₁, 40- FaHn, 47- FaYj, 51- FaFn₃, 13- BtBi, 24- BtGh, 28- BtBn, 31- BtShd, 36- BtHi, 17- MpKhr₁, 46- MpKhr₂, 4- FoGn, 27- FoTn, 16- FpEn, 35- FpKn, 19- FpBn, 21- LpNh, M- 50 bp ladder



شکل ۵- دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های هضم آنزیمی.
Fig. 5. PCR- RFLP dendrogram obtained from restriction analysis.

جدایه‌های BtBn، BtShd و BtHi در یک گروه قرار گرفتند که نشان می‌دهد جدایه‌های مربوط به یک میزبان شباهت زیادی به یکدیگر دارند. دو جدایه BtBn و BtShd، کاملاً از نظر خصوصیات مورفولوژیکی با جدایه BtHi که تولید هاگ نکرد، متفاوت بودند. قرار گرفتن این سه جدایه در یک گروه با تکثیر قطعات مورد نظر با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄ و IS₁/IS₃ نیز مطابقت داشت. در مکاتبات شخصی با پروفسور والتر گمس (W. Gams)، جدایه‌های مربوط به گونه *B. tomentellus* *N. cf. bromicola* شناسایی شدند.

در گروه سوم، جدایه‌های FaKn₁ و FaKn₃ که از نظر مورفولوژیکی کاملاً با هم متفاوت بودند در کنار هم قرار گرفتند. جدایه FaKn₂ تولید هاگ نکرد و پرگنه مومی شکلی داشت در حالی که پرگنه جدایه FaKn₁ نمدی شکل بود و هاگ‌هایی در سر تشکیل داد. PCR با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄ و IS₁/IS₃ و تکثیر قطعات مربوطه نشان داد که هر دو جدایه، اندوفیت و از جنس *Neotyphodium* هستند. در این گروه جدایه FoGn در یک شاخه جداگانه قرار گرفت که در نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژیک جدایه FoGn از نظر صفات مورفولوژیکی با بقیه جدایه‌ها متفاوت بود و در مکاتبات شخصی، پروفسور گمس این جدایه را *N. festucae* شناسایی کرد. قرار گرفتن دو جدایه FpKn و FpEn در یک کلاستر نشان دهنده شباهت ژنوتیپی آن‌ها به یکدیگر است که نتایج حاصل از داده‌های مورفولوژیکی نیز نشان داد که این دو جدایه بسیار به هم شبیه هستند. جای گرفتن جدایه LpNh در کنار این دو جدایه ولی در شاخه جداگانه نیز با داده‌های مورفولوژیکی تایید شد و هر سه جدایه از نظر شکل پرگنه و خصوصیات هاگ و کنیدیوفور بسیار شبیه به هم بودند. این نتایج با نتایج حاصل از PCR با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄ و IS₁/IS₃ و تکثیر قطعات مورد نظر تایید شد و مشخص شد که این سه جدایه از جنس *Neotyphodium* هستند. این سه جدایه با این‌که از نظر خصوصیات مورفولوژیک به جدایه‌های FaAh، FaEn، FaKh، FaFn₃، FaFn₂، FaHn و FaYj شبیه بودند ولی با جفت آغازگرهای 11₁/11₂ قطعه ۱۰۰۰ bp را تکثیر نکردند. این نتایج با نتایج حاصل از داده‌های برش آنزیمی نیز تایید شد. قرار گرفتن دو جدایه MpKhr₁ و MpKhr₂ در کنار این سه جدایه و در دو شاخه جداگانه، با نتایج حاصل از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی همخوانی نداشت به دلیل این‌که این دو جدایه از نظر خصوصیات مورفولوژیکی بسیار به هم شبیه بودند و کاملاً با جدایه‌های FpKn، FpEn و LpNh متفاوت بودند. برای یافتن میزان شباهت این جدایه‌ها باید هضم آنزیمی با تعداد بیشتری آنزیم برشی تکرار و توالی نوکلئوتیدی این جدایه‌ها با هم مقایسه گردد.

در گروه پنجم، جدایه‌های FaHn و FaYj در یک کلاستر قرار گرفتند که این نتایج با داده‌های مورفولوژیکی و PCR با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄، IS₁/IS₃ و 11₁/11₂، تایید شد و این دو جدایه براساس خصوصیات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی گونه

N. coenophialum شناسایی شدند. جدایه FoTN در شاخه‌ای جداگانه در کنار این دو جدایه قرار گرفت که این جدایه از نظر صفات مورفولوژیکی با دو جدایه قبلی متفاوت بود. در گروه ششم، با یک شاخه فقط جدایه FpBn قرار گرفت که این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه خصوصیات مورفولوژیک مطابقت داشت و این جدایه از نظر خصوصیات مورفولوژیکی با بقیه جدایه‌ها متفاوت بود. قرار گرفتن این جدایه در یک شاخه جداگانه با نتایج حاصل از PCR با جفت آغازگر ITS₁/ITS₄ و تکثیر قطعه ۷۵۰-۵۵۰ bp و عدم تکثیر قطعه ۴۴۴ bp با جفت آغازگر IS₁/IS₃ و عدم تکثیر قطعه ۱۰۰۰ bp با جفت آغازگر 11₁/11₂ تایید شد. دو جدایه BtBi و BtGh با وجود شباهت مورفولوژیکی در دو گروه جداگانه قرار گرفتند و پروفیسور گمس جدایه‌های مربوط به *B. tomentellus* را *N. cf. bromicola* تشخیص داد. این دو جدایه با جفت آغازگرهای ITS₁/ITS₄ و IS₁/IS₃ قطعات مورد نظر را تولید نمودند.

استفاده از PCR-RFLP نشان داد که گونه‌های اندوفیت جنس *Neotyphodium* روی میزبان‌های مختلف، همچنان که از نظر صفات مورفولوژیکی تفاوت‌هایی با یکدیگر دارند از نظر هضم آنزیمی نیز متفاوت بوده و این داده‌ها تا حدود زیادی یکدیگر را تکمیل می‌کنند و در نتیجه به احتمال زیاد در سایر قارچ‌ها نیز می‌توان از این نشانگر در بررسی‌های مولکولی به منظور مقایسه جدایه‌ها با یکدیگر استفاده نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای پروفیسور والتر گمس از مرکز CBS هلند به خاطر شناسایی و تایید برخی از گونه‌ها و ارسال نمونه‌های تیپ *Neotyphodium* و آقای دکتر رسول زارع به خاطر مشورت‌های ارزنده صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 4-2 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سعیده دهقانپور فراشاه (E-mail: sdfarashah@yahoo.com)، دکتر بهرام شریف نبی (E-mail: sharifnia@cc.iut.ac.ir) و دکتر آقا فخر میرلوحی (E-mail: mirlohi@cc.iut.ac.ir)، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

APPLICATION OF 5.8 S GENE AND ITS, PCR-RFLP PATTERNS IN TAXONOMY OF *NEOTYPHODIUM* ENDOPHYTIC FUNGI

S. DEHGHANPOUR FARASHAH, B. SHARIFNABI* and A.F. MIRLOHI

College of Agriculture, Isfahan Univ. of Technology, Isfahan, Iran

Received: 25.09.2005

Accepted: 09.05.2006

Endophytic fungi have mutualistic relationship with the plant family *Poaceae*. These fungi confer characteristics such as yield increase and biotic and abiotic stress resistance to host plants. Endophytes are classified in the family Clavicipitaceae. The endophytes spend all their life cycle in the aerial parts of plant hosts and live intercellularly. In the present investigation, endophytic fungi were isolated from seed and leaf sheath of *Festuca arundinaceae*, *F. ovina*, *F. pratensis*, *Bromus tomentellus*, *Melica persica* and *Lolium prene*. Genomic DNA was extracted and three sets of primers: ITS₁/ITS₄, IS₁/IS₃ and 11₁/11₂ were used to detect and identify endophytes. The results of PCR with three pairs of primers indicated that most of isolates used in research were endophytic fungi belonging to *Neotyphodium* and isolates of *F. arundinacea* were *N. coenophialum*. For amplification of ITS1/ ITS2 and 5.8 S gene, primers ITS1/ITS4 were used.

* Corresponding author

PCR products were digested by *Sau3AI* and *CfoI*. The results of PCR-RFLP showed that, restriction analysis is concordant with the morphological studies and PCR specific primers.

Key words: Endophytic fungi, *Neotyphodium*, PCR-RFLP, Taxonomy

To observe the figures and tables, please refer to the Persian text (pages: ۱-۱۵).

References

- BACON, C.W. and WHITE, Jr., J.F. 1994. Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC Press, Inc.
- BACON, C.W., RICHARDSON, M.D. and WHITE, Jr., J.F. 1997. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: A role for molecular technology. Crop Sci. 37: 1415-1425.
- BELESKY, D.P. and FEDDERS, J.M. 1995. Tall fescue development in response to *Acremonium coenophialum* and soil acidity. Crop Sci. 35: 529-553.
- BORAZJANI, R.N., LOTT, T.J. and AHEARN, D.G. 1998. Comparison of 5.8 S and ITS2, DNA RFLP patterns among isolates of *Acremonium obclavatum*, *A. killiense* and *A. strictum* from diverse sources. Current Microbiology 36: 7-74.
- BREM, D. and LEUCHTMANN, A. 2003. Molecular evidence for host-adapted races of the fungal endophyte *Epichloë bromicola* after presumed most shifts. Evolution. 57: 37-51.
- CUNNINGHAM, I.J. 1949. A note on the cause of tall fescue poisoning in cattle. Aust. Vet. J. 25: 27.
- DEHGHANPOUR FARSHAH, S., SHARIFNABI, B., MIRLOHI, A.F. 2005. Endophytic species of *Neotyphodium* on some gramineous species in Iran. Rostaniha 6: 131-150 (in Persian with English summary).

- DOSS, R.P. and WELTY, R.E. 1995. A polymerase chain reaction based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology* 85: 913-916.
- DOSS, R.P., CLEMENT, S.L., KUY, S.R. and WELTY, R.E. 1998. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. *Plant Dis.* 82: 738-740.
- GANJALI, R., SHARIFNABI, B., MIRLOHI, A.F. 2004. Classical methods and specific primers in detection of endophytic fungi in some gramineous plants. *Rostaniha* 5: 37-51 (in Persian with English summary).
- HIATT, E.E., HILL, N.S., BOUTON, J.H. and MIMS, C.W. 1997. Monoclonal antibodies for detection of *Neotyphodium coenophialum*. *Crop Sci.* 37: 1265-1269.
- LATCH, G.C.M., CHRISTENSEN, M.J. and SAMUELS, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. *Mycotaxon* 20: 535-550.
- LEUCHTMAN, A. and SCHARDL, C.L. 1998. Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloë* and other congeneric European species. *Mycol. Res.* 102: 1169-1182.
- LEUCHTMANN, A. and SCHARDL, C.L. 1994. Sexual compatibility and taxonomy of a new species of *Epichloë* symbiotic with fine fescue grasses. *Mycologia* 86: 802-812.
- LIU, D., VAN HEESWIJCK, R., LATCH, G., LEONFORT, T., PANACCIO, M., LANGFORD, C., CUNNINGHAM, P. and REED, K. 1995. Rapid identification of *Acremonium lolii* and *Acremonium coenophialum* endophytes through arbitrarily primed PCR. *FEMS Microbiology Letters* 133: 95-98.
- MARSHALL, D., TUNALI, B. and NELSON, L. 1999. Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. *Crop Sci.* 39: 1507-1512.
- MORGAN-JONES, G. and GAMS, W. 1982. Notes on *Hyphomycetes* XLI. An endophyte of *Festuca arundinacea* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two sections of *Acremonium*. *Mycotaxon* 15: 316-318.

- SAHA, D.C., JAKSON, M.A. and JAKSON-CICALESE, M.J. 1988. A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. *Phytopathology* 78: 237-239.
- SCHARDL, C.L. 1993. Evolution of endophytes of tall fescue and perennial ryegrass. Proceedings of the Second International Symposium on *Acremonium*/grass interaction, New Zealand. pp. 63-77.
- VAN ZIJLL DE JONG, 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 endophytes. *Genome* 46: 277-290.
- WHITE, Jr., J.F. 1994. Endophyte-host associations in grasses. XX. Structural and reproductive studies of *Epichloë amarillans* sp. nov. and comparison to *E. typhina*. *Mycologia* 86: 571-580.
- WHITE, Jr., J.F., 1993. *Epichloe* and *Acremonium* endophytes of grasses: Systematic and experimental studies. Proceedings of the 2nd International Symposium on *Acremonium*/Grass Interaction, New Zealand. pp. 47-57.

Addresses of the authors: S. DEGHANPOUR FARASHAH, Former graduate student of Plant Pathology (E-mail: sdfarashah@yahoo.com); Dr. B. SHARIFNABI, Assist. Prof. of Mycology (E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir), and Dr. A.F. MIRLOHI, Associate Prof. of Plant Breeding (E-mail: mirlohi@cc.iut.ac.ir), College of Agriculture, Isfahan Univ. of Technology, Isfahan, Iran.