

Specific PCR-primers for detection of *Picoa lefebvrei* desert truffle in *Carex stenophylla* roots

Received: 21.09.2015 / Accepted: 25.10.2015

Samad Jamali: Assistant Prof., Mycology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (jamali454@yahoo.com)

Picoa species are hypogeous desert truffles, which can be found in semi-arid ranges of North Africa, West Asian, South of Europe and Middle East, including Iran (Moreno *et al.* 2000, Jamali & Banhashemi 2012, 2013). *Picoa* species form symbiosis mainly on roots of annual and perennial herbaceous plants of the *Helianthemum*, including *H. ledifolium* and *H. salicifolium* var. *salicifolium* (Jamali & Banhashemi 2012, 2013), *H. nummularium* (Riousset *et al.* 1989, 1996), *H. sessiliflorum* (Sbissi *et al.* 2010), *H. squamatum* and *H. kahiricum* (Moreno *et al.* 2000). In Iran, mycorrhizal association between sedge and desert truffles is little known. Ammarellou *et al.* (2007) isolated the sedge roots (*Kobresia bellardii*) directly from under zone of *Terfezia boudieri*. During 2013–14, roots of *Carex stenophylla* Wahlenb were collected from various rangeland sites in Iran. The field and anatomical studies showed that, *C. stenophylla* have ectomycorrhizal associations with *P. lefebvrei* in the studied areas. In general, external mycelium was observed around all the mycorrhizal plants. The ITS1-5.8S-ITS2 gene region was amplified with the genomic DNA extracted from roots by nested polymerase chain reaction using the universal fungal primer pair ITS1/ITS4 and specific primer pair FLE (5'GTA CCT TAC CTG TTG CTT CCG TG) and RLE (5'ATC CCT ACC TGA GCC GAG GTC AA) which were designed based on ITS1-5.8S-ITS2 gene region of *Picoa lefebvrei*. Nested PCR of ITS1/ITS4 amplified product with FLE/RLE primers resulted in amplification of 500 bp products in *C. stenophylla* roots. Sequences of PCR products amplified by FLE/RLE in two randomly root samples were similar (100%) with previously published DNA sequences of *P. lefebvrei* specimens and confirmed the existence of *P. lefebvrei* in mycorrhizal roots of *C. stenophylla* in the rangelands of Iran. Moreover, nested PCR increased the sensitivity of FLE/RLE primers to 10 fg DNA concentration.

آغازگرهای اختصاصی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ردیابی *Picoa lefebvrei* در ریشه‌های *Carex stenophylla*

دریافت: ۱۳۹۴/۶/۳۰ / پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۳

صمد جمالی: استادیار قارچ‌شناسی بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (jamali454@yahoo.com)

خلاصه

گونه‌های *Picoa*، آرایه‌های آسکومیست زیرزمینی می‌باشند که در نواحی نیمه‌خشک شمال آفریقا، غرب آسیا، جنوب اروپا و کشورهای خاورمیانه از جمله ایران یافت می‌شود. گونه‌های این جنس با ریشه گیاهان علفی یک‌ساله و چندساله از جنس *Helianthemum* شامل: *H. ledifolium*، *H. salicifolium* var. *salicifolium*، *H. nummularium* و *H. squamatum* تشکیل قارچ-ریشه می‌دهند. در ایران، رابطه قارچ-ریشه بین دنبل‌های بیابانی و گیاهان تیره جگنیان به طور کامل بررسی نشده است. در این مطالعه، ریشه‌های *Carex stenophylla* Wahlenb از مراتع مختلف جمع‌آوری شد که بررسی‌های مزرعه‌ای و آناتومیکی رابطه قارچ-ریشه خارجی این گونه گیاهی با دنبل بیابانی *P. lefebvrei* را مشخص کرد. میسلیم‌های خارجی در اطراف تمام ریشه‌های تشکیل دهنده قارچ-ریشه مشاهده شدند. نواحی یگانه توالی‌های جداکننده نسخه‌برداری شده داخلی ۱، ۲ و ژن ۵/۸ اس دی.ان.ای. ریبوزومی گونه قارچی در ریشه گیاهان با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تو در تو و استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1/ITS4 و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده (FLE 5'GTA CCT TAC CTG TTG CTT CCG TG)، (RLE 5'ATC CCT ACC TGA GCC GAG GTC AA) تکثیر شد. با استفاده از این روش، محصولی به اندازه ۵۰۰ جفت باز از ریشه گیاهان همزیست به دست آمد که با نمونه‌های *P. lefebvrei* ثبت شده در بانک ژن صد در صد شباهت داشتند. این موضوع ثابت کرد که محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی، متعلق به گونه *P. lefebvrei* بوده و به این ترتیب ارتباط میکوریزی این گونه قارچی با گونه گیاهی *C. stenophylla* به اثبات رسید.

References

- Ammarellou, A., Saremi, H. & Guzin, F. 2007. Evaluation of morphology, cytology and mycorrhizal relationships of desert truffles in Iran. *Pakistan Journal of Biological Science* 10: 1486–1490.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. 2012. Host and distribution of desert truffles in Iran, based on morphological and molecular criteria. *Journal of Agricultural Science and Technology* 14: 1379–1396.
- Jamali, S. & Banihashemi, Z. 2013. Species-specific ITS primers for the identification of *Picoa juniperi* and *Picoa lefebvrei* ascocarps and detection in planta. *Molecular Biology Reports* 40(9): 421–433.
- Moreno, G., Diez, G.J. & Manjon, J.L. 2000. *Picoa lefebvrei* and *Tirmania nivea*, two rare hypogeous fungi from Spain. *Mycological Research* 104: 378–381.
- Riousset, L., Riousset, G., Jalade, M. & Chevalier, G. 1989. Prima raccolta in Francia di *Phaeangium lefebvrei* Patouillard 1894. *II Fungo*: 9–11.
- Riousset, L., Riousset, G., Jalade, M. & Chevalier, G. 1996. Prima raccolta in Francia di *Picoa lefebvrei* (Patouillard) Maire 1906. *II Fungo (Suppl. 3)*: 15–17.
- Sbissi, I., Neffati, M., Boudabous, A., Murat, C. & Gtari, M. 2010. Phylogenetic affiliation of the desert truffles *Picoa juniperi* and *Picoa lefebvrei*. *Antonie van Leeuwenhoek* 98: 429–436.

ROSTANIHA