مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۶۷-۵۸

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p. 58-67

تهیه شناسنامه مولکولی برای ۱۲ نژاد اصلاح شده قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* با استفاده از نشانگرهای AFLP

پریسا قربانی فعال [۱]- محمد فارسی [۲*] - حمید رضا پوریان فر [۳] - محسن محمودنیا میمند [۴] - جعفر ذوالعلی [۵]

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۴
تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۲۵

چکیده

به دلیل سهولت تکثیر رویشی نژادهای اصلاحی قارچ‌های خوراکی، حفاظت از نژادهای اصلاح شده امری جدی و ضروری است. نشانگرهای مولکولی AFLP به دلیل سرعت، دقت، پوشش بالای ژنوم و نیز ارائه نتایج قابل اعتماد و تکرارپذیری بالا, قابلیت زیادی در انگشت‌نگاری ژنتیکی دارند. در این پژوهش DNAی ژنومی ۱۲ نژاد تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus*, توسط دو آنزیم *Eco*RI و*Tru*9I برش داده شده و پس از اتصال رابط‌ها و تکثیر پیش انتخابی و انتخابی با استفاده از هشت ترکیب جفت آغازگری (*Eco*RI/*Tru*9I)، ۵۰۱ باند قابل امتیازدهی ایجاد شد که ۵۴ عدد (۱۰/۸٪) از آنها چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل (۱۲ باند) با استفاده از ترکیب آغازگری (*E*coRI-CT/ *Tru*9I-TC) و کمترین تعداد باند چندشکل (۲ باند) با استفاده از ترکیب آغازگری (*Eco*RI-CAC/ *Tru*9I-AG) حاصل شد. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها بین ۰/۱۴ تا ۰/۹۵ متغیر بود و دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار Ntsys، سه گروه اصلی را بین ۱۲ نژاد مشخص کرد. با توجه به الگوی انحصاری باندهای حاصل از هشت جفت آغازگر در هر نژاد، تمایز بین آنها میسر بود.

واژه‌های کلیدی: قارچ دکمه‌ای، نژادهای اصلاحی، ترکیب آغازگری، AFLP ، شناسنامه مولکولی

مقدمه

قارچ‌های خوراکی، به ویژه قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، از اهمیت تجاری و اقتصادی ویژه‌ای برخوردارند و همین مسئله سبب می‌شود تا به‌نژادگران در پی ثبت نژادها و اخذ مالکیت معنوی برای آنها باشند. اصولا تکثیر ساده و سریع میسلیوم قارچ‌های خوراکی به روش غیر جنسی (اسپاون)، موجب می‌شود تا برخی شرکت‌های تولیدکننده اسپاون تجاری بتوانند بدون کسب مجوز از تولیدکننده اصلی آن، نسبت به تکثیر نژادهای اصلاح شده اقدام نمایند، امری که از نظر حقوق مادی و معنوی خلاف است و تداوم برنامه‌های اصلاحی قارچ‌های خوراکی را دچار مشکلات جدی می‌نماید. در حال حاضر راهکار قانونی پذیرفته شده‌ای برای اثبات تکثیر غیر مجاز یک نژاد اصلاح شده وجود ندارد. لذا استفاده از نشانگرهای ژنتیکی قابل اعتماد و کارآمد امری ضروری می‌نماید. نشانگرهای AFLP (Amplified Length Polymorphism) در آشکار ساختن تفاوت‌های ژنتیکی در سطح DNA پتانسیل بسیار بالایی دارند. از این روش بدلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد مطالعه و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا, بطور وسیعی برای تهیه نشانگرهای چندشکل استفاده می‌شود (۶). تاکنون نشانگرهای AFLP جهت شناسایی ژنتیکی و انگشت‌نگاری بسیاری از گیاهان، باکتری‌ها، نماتدها و قارچ‌های بیمارگر استفاده شده که نتایج قابل ملاحظه‌ای بدنبال داشته‌است. همچنین تشخیص هویت ژنتیکی افراد حاصل از تکثیر غیرجنسی و نقشه‌یابی مکان‌های ژنی صفات کمی (QTLs- Quantitative Trait Loci) از جمله کاربردهای برجسته این نشانگر بوده است (۱۳).

استفاده از نشانگرهای AFLP برای تفکیک نژاد در قارچ‌های خوراکی در طی چند سال اخیر روندی رو به گسترش داشته است. در یک پژوهش، پنج نژاد زراعی و بیست نژاد وحشی هتروکاریوتیک قارچ دکمه‌ای (*A. bisporus*) مورد بررسی قرار گرفتند. اگرچه

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول Email: mfarsi@yahoo.com)
۳- عضو هیات علمی جهاد دانشگاهی مشهد، گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی
۴و۵- دانشجویان دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

الگوهای باندی پنج نژاد زراعی تقریبا یکسان بود، ولی هنوز امکان تمایز آنها از یکدیگر وجود داشت (۱۰). از روش AFLP برای تمایز نژادی قارچ خوراکی *A. bitorquis* یک گونه خویشاوند با قارچ *A. bisporus* نیز استفاده شده است. در یک پژوهش، با استفاده از شش ترکیب جفت آغازگری مجموعا ۲۷۱ باند تولید شد که ۹۱/۱۴٪ آنها چند شکل بودند. در این آزمایش، قابلیت نشانگرهای مولکولی AFLP در تفکیک گونه‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی این قارچ نشان داده شد. یافته‌های این پژوهش به‌خصوص می‌تواند برای به‌نژادگران در دورگ‌گیری بین والدین متفاوت درون گروه‌های سازگار مفید واقع شود (۲۰). از نشانگرهای AFLP برای تمایز میان نژادهای زراعی و نیز جدایه‌های تک اسپوری قارچ *A. blazei* (قارچ بومی کشور برزیل) استفاده شده است. بدین منظور پنج ترکیب آغازگری در ۹ نژاد زراعی استفاده شد، که حاصل آن ۱۶۵ باند چندشکل از میان ۲۶۷ باند حاصل بود. نشانگر AFLP در میان جدایه‌های تک اسپوری باندهای منحصر بفرد ایجاد کرد. همچنین تعداد کل باندهای بدست آمده در میان جدایه های تک اسپوری به طور مشخصی از تعداد باندهای نژادهای والدی بیشتر بود. این گروه تحقیقاتی توانستند از این نشانگر برای اثبات موفقیت تلاقی‌های دورگ در قارچ *A. blazei* استفاده کنند (۱۲). گزارشات منتشر شده نشان می‌دهد بیشترین کاربرد AFLP در قارچ خوراکی- دارویی شی‌تاکه (*Lentinula edodes*) بوده است. تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی در نژادهای تجاری شی‌تاکه (۲۱)، تهیه نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی (۱۷) و تعیین نژاد در ارقام قارچ شی‌تاکه (۱۶)، از جمله گزارشات منتشر شده در این ارتباط هستند. از نشانگرهای AFLP برای تعیین نژادی در نژادهای تجاری قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostratus*) نیز استفاده شده است (۱۱). در سال ۲۰۰۷ طی یک تحقیق، از دو نشانگر (AFLP و RFLP) روی ژن‌های لاکاز و منگنزپراکسیداز برای ایجاد تمایز و تشخیص مجموعه‌ای از نژادهای قارچ صدفی شاه بلوط (*P. eryngii*) استفاده شد. هر دو نشانگر یاد شده قدرت گروه بندی مجموعه را به سه دسته داشتند، اما نشانگر AFLP توانایی بیشتری در آشکارسازی چندشکلی در میان نژادها نشان داد (۱۸).

در کشور ما برای اولین بار در سال ۱۳۸۴ استفاده از فناوری AFLP روی قارچ خوراکی دکمه‌ای بهینه سازی شد و قابلیت آن در انگشت‌نگاری ژنتیکی به اثبات رسید. ولی به دلیل کاربرد تنها یک ترکیب جفت آغازگری به همراه دو باز انتخابی، نتایج به دست آمده کاربرد زیادی نداشتند (۶). لذا در این پژوهش به منظور دست‌یابی به شناسنامه مولکولی چند نژاد اصلاحی تجاری این قارچ، از هشت ترکیب جفت آغازگری در تکثیر انتخابی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نژادهای قارچی: دوازده نژاد اصلاح شده قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*A. bisporus*) بصورت کشت میسلیوم در محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) (۵)، از آزمایشگاه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد دریافت شدند. برای تکثیر و نگهداری نژادها از محیط کشت CE/CYM با کمی تغییرات در روش کالوو- بادو و همکاران استفاده شد (۷). کشت‌های مایع به منظور تهیه میسلیوم کافی، در بطری های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت CE/CYM با استفاده از قطعاتی به طول دو و عرض یک سانتی متر، با کمترین میزان آگار از کشت پایه تهیه شدند.

جداسازی DNA: جداسازی DNAی ژنومی بر اساس روش مبتنی بر CTAB از میسلیوم حاصل از کشت مایع ۲۱ روزه قارچ ها انجام شد. روش مورد استفاده بر اساس اندکی تغییر در دستورالعمل آزمایشگاه Soltis موسسه موزه تاریخ طبیعی فلوریدا بود (۱۵)، که خود از دو روش دویل و دویل (۹) و کالینگز (۸) استفاده کرده است. مقدار و کیفیت DNAی ژنومی بدست آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفتومتری بررسی شد.

آزمایش‌های AFLP: مراحل مختلف AFLP بر اساس روش مرسوم وس و همکاران (۱۹) و با اندکی تغییرات صورت گرفت. به طور خلاصه DNAی ژنومی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Tru*9I، (هر دو از شرکت Roche)، هضم آنزیمی شد. به منظور هضم کامل ژنوم، محلول واکنش به مدت دو ساعت در دمای ۳۷°C و دو ساعت در دمای ۶۵°C که به ترتیب بهترین دما برای عمل آنزیم‌های *Eco*RI و *Tru*9I می‌باشند، قرار گرفت. سپس رابط‌های دورشته‌ای طی چهار ساعت در دمای ۱۲°C به انتهای قطعات برش یافته متصل شدند. تکثیر قطعات طی دو مرحله انجام گرفت. تکثیر پیش انتخابی بدون استفاده از باز انتخابی در انتهای ´۳ و با دمای اتصال ۵۴°C در طول ۳۰ چرخه انجام شد. تکثیر انتخابی با استفاده از دو یا سه باز انتخابی در انتهای ´۳ انجام گرفت. در تکثیر انتخابی در طی ۱۴ چرخه ابتدایی هر بار به میزان ۰/۷ درجه از دمای اتصال ابتدایی (C ۶۳°) کاسته شد که سبب تکثیر انتخابی تر باندها می‌شود (Touch down). ۲۲ چرخه انتهایی بدون کاهش دما، با درجه اتصال ۵۵°C صورت گرفت. عمل بسط در دمای ۷۲°C و به مدت ۶۰ ثانیه در هر چرخه انجام شد. برای مشاهده الگوی باندی از ژل پلی‌آکریلامید واسرشت ۶٪ در دستگاه الکتروفورز عمودی مدل S2001 (از شرکت Life Technologies ™) و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره استفاده گردید (۱۴)، سپس از نیمرخ‌های باندی بدست آمده عکسبرداری شد. در مجموع بر اساس هشت آغازگر از *Eco*RI و نه آغازگر از *Tru*9I، ۷۲ ترکیب آغازگری بررسی گردید که با توجه به تعداد باند، میزان چند شکلی و نیز وضوح باندها، هشت ترکیب انتخاب شد (جدول ۱). الگوهای باندی بر اساس نتایج تکثیر انتخابی با جفت آغازگرهای گزینش شده تجزیه و تحلیل نهایی شدند (شکل ۱).

(جدول۱)- ترکیب های مختلف آغازگری به کار رفته در این پژوهش

	بازهای انتخابی بکار رفته در انتهای ´۳ آغازگرها								
*Eco*RI	aa	ag	cc	ct	tc	gc	aac	cac	
*Tru*9I	aa	ag	cc	ct	tc	gt	gtc	acg	cct

(جدول ۲)- توصیف باندهای تولید شده توسط هشت جفت آغازگر گزینش شده

باند چندشکل	تعداد کل باند	باز انتخابی Tru9I	باز انتخابی ***Eco*-RI**
۲	۶۴	AG	CAC
۱۲	۸۴	TC	CT
۴	۸۴	GT	CT
۷	۵۱	ACG	CT
۱۱	۵۴	CCT	CT
۳	۴۱	ACG	CC
۶	۶۲	AG	CC
۹	۶۱	GT	GC
۵۴	۵۰۱	جمع	
۶/۷۵	۶۲/۶۲	میانگین	

برای تجزیه و تحلیل باندها, امتیازدهی آنها به صورت (۱) و (۰) به ترتیب برای حضور و عدم حضور باند انجام شد. داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار (Ntsys version 2.02e) منتقل شدند.

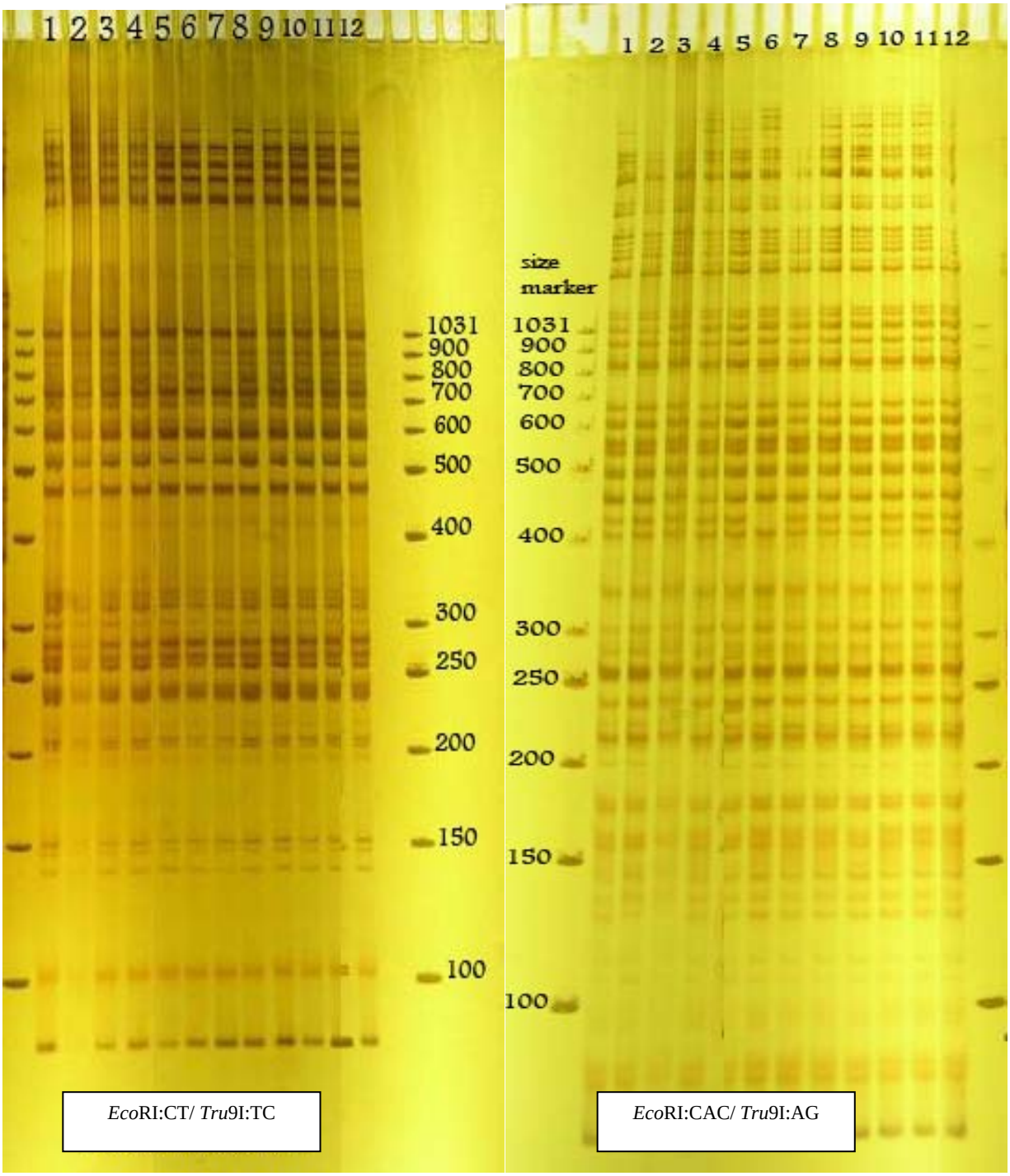
نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل الگوهای باندی: هشت ترکیب جفت آغازگر برای ۱۲ نژاد قارچ دکمه‌ای سفید، در مجموع ۵۰۱ باند قابل امتیازدهی تولید کرد که اندازه آنها در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز بود. در این بین، ۵۴ باند چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده و چند شکل به ازای هر جفت آغازگر به ترتیب ۶۲/۶۲ و ۶/۷۵ بود (۱۰/۸٪). توانایی جفت آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چندشکلی در بین نژادهای مختلف قارچ دکمه‌ای سفید متغیر بود. در این میان، ترکیب جفت آغازگری (EcoRI-CT/Tru9I-TC) دارای بیشترین تعداد باند چند شکل (۱۲باند) و ترکیب جفت آغازگری (EcoRI-CAC/Tru9I-AG) دارای کمترین تعداد باند چند شکل (دو باند) بود (شکل ۱). ماتریس قرابت ژنتیکی با استفاده از ضریب جاکارد (جدول ۳) و همچنین نمودار خوشه‌ای (شکل ۲) با روش UPGMA بدست آمد. بر اساس داده‌های AFLP ، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۱۴ تا ۰/۹۵ متغیر بود و میانگین حسابی شباهت ژنتیکی بین تمام جفت نمونه‌ها ۰/۵۷ محاسبه گردید. جفت نمونه‌های IM-Ca010 و IM-Ca014 با بیشینه شباهت (۰/۹۵) و نمونه‌های IM-003 وIM-Ho010 با کمینه تشابه ژنتیکی (۰/۱۴) مشاهده شدند (جدول ۲).

دندروگرام حاصل از نرم افزار(Ntsys (ver.2.02 با استفاده از روش UPGMA (شکل۲) با شباهت ژنتیکی ۷۵٪، دورگ‌های مورد بررسی را در سه گروه اصلی جای داد.

گروه اول شامل نژادهای IM-002، IM-005 و IM-006 و گروه دوم شامل نژاد IM-003 بود. نژادهای IM-008، IM-037، IM-Ho-010، IM-Ho-012، IM-Ho-014، IM-Ho-015، IM-Ca-010 و IM-Ca-014 در گروه سوم جای گرفتند. نژادهای گروه یک دورگ‌های اصلاح شده در جهاد دانشگاهی مشهد بودند که مجموعا از نظر عملکرد در رتبه‌های پایین‌تری نسبت به سایر نژادها قرار دارند (۴).

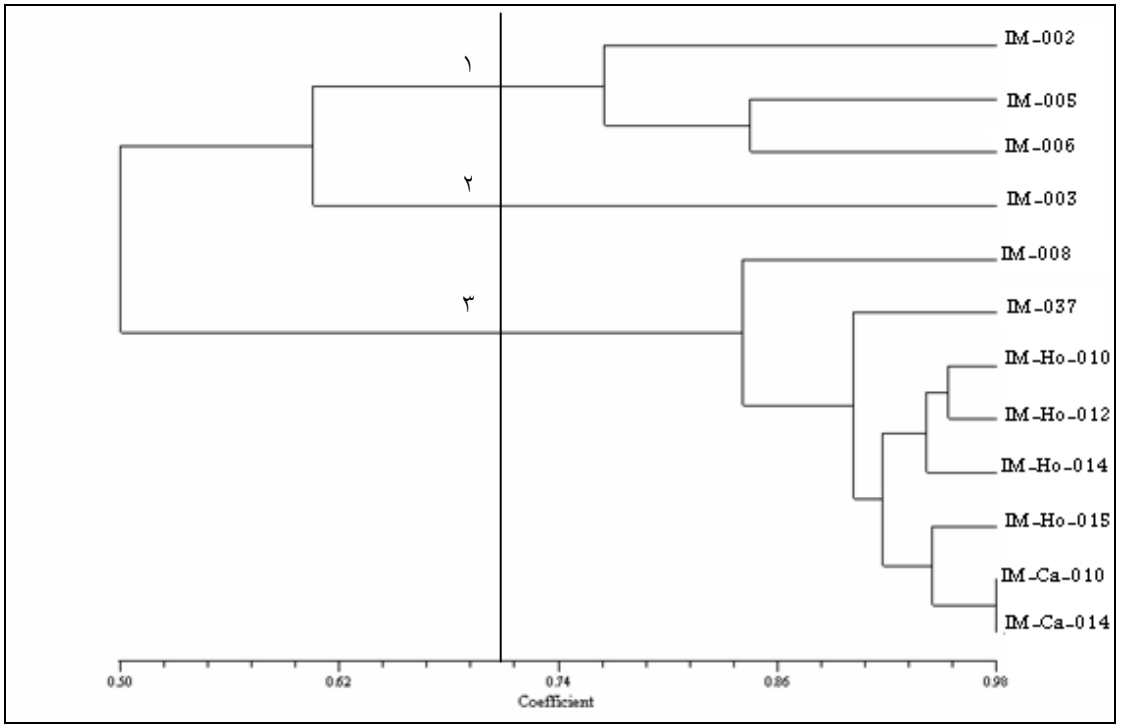
نژاد IM-003 دورگ پر محصولی است که با وجود عملکرد بالا، به لحاظ ژنتیکی تشابه اندکی با نژادهای پر محصول گروه سه دارد (۲۸-۱۴٪). والدین این نژاد کاملا از نژادهای IM-008 و IM-037 متفاوت‌اند، همچنین مسیرهای اصلاحی کاملا متفاوت و گزینش زیاد می‌تواند علت اختلاف موجود باشد.



(شکل ۱)- نیمرخ ژل پلی آکریلامید واسرشت ٦٪ با استفاده از دو ترکیب جفت آغازگری:(*Eco*RI:CT/*Tru*9I:TC) و(*Eco*RI:CAC/*Tru*9I:AG) از میان ۸ ترکیب گزینش شده. اعداد ۱۲-۱ به ترتیب نماینده نژادهـای IM-002, IM-003, IM-005, IM-006, IM-008, IM-037, IM- IM-Ho012, IM-Ho014, IM-Ho015, IM-Ca010, Ho010, IM-Ca012و می‌باشند.

(جدول۳)- ماتریس شباهت ژنتیکی ۱۲ نژاد قارچ دکمه‌ای مبتنی بر داده‌های AFLP با استفاده از ضریب جاکارد در نرم افزارNtsys. اعداد خاکستری، بیشینه و کمینه شباهت را نشان می‌دهند.

	IM-002	IM-003	IM-005	IM-006	IM-008	IM-037	IM-Ho010	IM-Ho012	IM-Ho014	IM-Ho015	IM-Ca010	IM-Ca014
IM-002	1											
IM-003	0.46	1										
IM-005	0.62	0.40	1									
IM-006	0.60	0.42	0.72	1								
IM-008	0.36	0.22	0.24	0.37	1							
IM-037	0.41	0.21	0.26	0.36	0.70	1						
IMHo-010	0.36	0.19	0.26	0.36	0.68	0.80	1					
IM-Ho012	0.42	0.14	0.32	0.40	0.68	0.84	0.90	1				
IM-Ho014	0.45	0.17	0.32	0.46	0.76	0.84	0.86	0.90	1			
IM-Ho015	0.41	0.16	0.31	0.42	0.74	0.78	0.84	0.88	0.88	1		
IM-Ca010	0.40	0.17	0.26	0.38	0.72	0.79	0.77	0.81	0.85	0.87	1	
IM-Ca014	0.42	0.28	0.27	0.40	0.75	0.82	0.80	0.84	0.88	0.91	0.95	1



(شکل ۲)- دندروگرام بدست آمده از روش UPGMA برای ۱۲ نژاد قارچ دکمه‌ای سفید با استفاده از نشانگرهای AFLP

در گروه سوم نژادهای IM-Ca-010 و IM-Ca-014 (که جدایه‌های تک‌اسپوری یک نژادند)، به علت هم نسل بودن در طی تکامل و ماهیت چرخه‌ی جنسی قارچ *A. bisporus* از تشابه زیادی برخوردارند (۹۵٪). همچنین جدایه‌های تک‌اسپوری IM-Ho-010، IM-Ho-012، IM-Ho-014 و IM-Ho-015 به دلایل فوق از لحاظ ژنتیکی تقریبا مشابه‌اند (۹۰-۸۴٪). پیشینه‌ی اصلاحی نژاد IM-

037، به صورت (MC392-17 × MC378-53) است، که هر دو والد آن از نژاد U1 می‌باشند. IM-008 یک دورگ اصلاحی با عملکرد بالا است که در طی یکی از طرح‌های پژوهشی جهاد دانشگاهی تولید شده است (۵). در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، عملکرد این نژاد بطور معنی‌داری از شاهد (نژاد زراعی که برای تولید اسپاون در گروه زیست فن آوری قارچ های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد به کار می‌رود) و نیز نژادهای مورد بررسی بیشتر بود. لازم به ذکر است که یکی از والدین IM-008، دورگ IM-037 بود که لذا تشابه ۷۰ درصدی IM-037 و IM-008 را توجیه می‌کند. جالب توجه است که در این گروه نژادهایی قرار گرفتند که همه عملکرد بالایی دارند. با وجود این برای به دست آوردن پیوستگی صفت پیچیده‌ی عملکرد با باندهای AFLP، آنالیز همبستگی باید انجام شود. شاید بتوان حدس زد که دو جدایه تک اسپوری کانادایی (IM-Ca-010، IM-Ca-014) که شباهت بالایی با نژادهای تک اسپوری گرفته شده از نژاد اروپایی Holland737 و تفاوت محسوسی با نژاد گروه های ۱ و ۲ نشان دادند، از منشاء U3 می‌باشند. این حدس هنگامی قویتر می‌شود که در نظر بگیریم که نژادهای IM-002 و IM-005 کاملا متعلق به U1 بوده و یکی از والدین نژاد IM-006 نیز از منشاء U1 می‌باشد. توضیح آنکه U1 و U3 دو واریته‌ی مهم و اصلی در قارچ دکمه‌ای سفیداند که اختلافاتی در رنگ میسلیوم و کلاهک با هم دارند (U1: off white, U3: White). معمولا U1 در آمریکا و بسیاری دیگر از کشورهای دنیا، از جمله ایران، کشت می‌شود در حالیکه در اروپا بیشتر از U3 استفاده می‌شود (۳).

نیمرخ ژل AFLP برای ۱۲ نژاد مختلف قارچ، باندهای متفاوت نشان داد. بر اساس الگوهای باندی متفاوت، می‌توان مشاهده کرد که نژادهای اصلاح شده مختلف از همدیگر کاملا متمایز شدند. با توجه به این نتایج می‌توان برای هر نژاد یک شناسنامه‌ی مولکولی منحصر به فرد ایجاد کرد که در آن به وجود باند عدد ۱ و فقدان آن عدد صفر نسبت داده شود. در این شناسنامه سه جزء جفت آغازگر، اندازه‌ی باند و حضور یا عدم حضور باند وجود دارد که بر اساس آن افراد از یکدیگر کاملا متمایز می‌شوند. به عبارت دیگر، هر فرد دارای یک کد ۵۴ رقمی (متناظر با ۵۴ اندازه باند چند شکل) است که به هیچ وجه با کد ۵۴ رقمی نژاد دیگر یکسان نیست. از سویی دیگر وجود وعدم وجود انحصاری برخی از باندها، دلیل دیگری بر توانمندی نشانگرهای AFLP در تمایز نژادهای اصلاحی می‌باشد. این نتایج بر خلاف نتایج لی (۲۰۰۱) است که گزارش نمود الگوهای باندی پنج نژاد زراعی قارچ دکمه‌ای حاصله از AFLP تقریبا یکسان بودند (۱۰). اما از سوی دیگر، آزمایشات AFLP با استفاده از شش ترکیب جفت آغازگری بر روی قارچ *A. bitorquis* مجموعا ۲۷۱ باند و ۹۱/۴٪ چند شکلی تولید کرد (۲۰). این در حالیست که در این پژوهش ۵۰۱ باند قابل رتبه‌بندی تولید شده و میانگین تعداد باندهای چند شکل به ازای هر جفت آغازگر ۶/۷۵ بود (۱۰/۸٪). چند شکلی پایین در نژادهای تجاری قارچ دکمه‌ای امری است طبیعی و به این نکته برمی‌گردد که در کشت این قارچ منحصرا از برخی از نژادهای تجاری مادری استفاده می‌شود که به مرور زمان نژادهای تجاری مختلفی از این نژادهای مادری منشاء گرفته‌اند. لذا همانطور که اوربانلی و همکاران (۲۰۰۷) اشاره کرده‌اند جمعیت‌های وحشی قارچ‌های خوراکی پاسخی به این مشکل هستند چراکه آنها منابع مهمی برای اعطای تنوع ژنتیکی به لاین‌های تجاری هستند که در اثر گزینش‌های مکرر تنوع ژنتیکی خود را از دست داده‌اند (۱۸). با وجود این، پژوهش حاضر روشن ساخت که AFLP می‌تواند حتی برای هر نژاد تجاری، الگوهای باندی منحصر به فردی تولید نماید که توسط هشت ترکیب جفت آغازگری تکثیر شده‌اند. از سوی دیگر، نتایج این تحقیق روشن ساخت که وجود و عدم وجود منحصر به‌فرد برخی از باندها (دارای علامت ستاره در جدول ۴) کمک موثری در تمایز نژادی می‌کند و حتی می‌تواند مورد توالی‌یابی قرار گرفته و خود به‌عنوان نشانگرهایی جدید در تشخیص سریع و دقیق هر نژاد به‌کار آید. این موضوع در سایر تحقیقاتی که بر روی انگشت نگاری ژنتیکی قارچ‌های خوراکی انجام شده است، مورد بحث قرار نگرفته است(۱۰،۱۶، ۲۰و۲۱).

با توجه به مزیت تکرار پذیر بودن نشانگرAFLP که در این آزمایش دو بار تکرار شد، شناسنامه مولکولی بدست آمده موثق و کاملا کاربردی است. جدول۴ نشان می‌دهد، ۵۴ باند چند شکل بدست آمده از طریق هشت جفت ترکیب آغازگری انتخابی برای هر نژاد، کافی است تا آن نژاد را از نژادهای دیگر متمایز کند. در این میان باندهای منحصربفرد در نژادهای مختلف، ممکن است بیانگر خصوصیت ویژه ای در هر نژاد باشد که با جداسازی و توالی یابی آنها و تهیه نشانگرهای مرتبط با آنها مانند نشانگر SCAR در جهت تسهیل انتخاب و تمایز نژادهای برتر اقدام کرد. ماتریس شباهت، بیانگر قرابت ژنتیکی بین نژادهاست و اختلافات موجود را بر اساس مسیرهای اصلاحی متفاوت بیان می‌کند. اطلاع از میزان قرابت ژنتیکی نژادها در برنامه‌های دورگ‌گیری امری ضروری است چراکه پدیده سودمند هتروزیس با افزایش فاصله در میان نژادهای والدی افزایش می‌یابد. همچنین تعداد زیادی باند واضح قابل امتیازدهی در منطقه‌ی بالاتر از ۱۰۰۰ جفت باز قرار دارند که در تجزیه و تحلیل وارد شدند. اما این باندها در محدوده‌ی نشانگر اندازه‌ی مورد استفاده نبودند. لذا می‌توان از آنزیم‌های برشی با تعداد بیشتر منطقه برش بر روی ژنوم برای هضم DNAی ژنومی استفاده کرد، تا الگوی باندی دقیق‌تری حاصل آید. از سوی دیگر با توجه به برتری توالی‌های تکراری GC در ژنوم قارچ‌ها(۲)، استفاده از آنزیم‌های برشی با توالی برشی سرشار از این بازهای آلی می‌تواند کارا باشد.

(جدول٤)- شناسنامه‌ی مولکولی نژادها

ترکیب جفت آغازگری	اندازه(bp)	IM-002	IM-003	IM-005	IM-006	IM-008	IM-037	IM-Ho01	IM-Ho01 2	IM-Ho01 4	IM-Ho01 5	IM-Ca01 0	IM-Ca01 4
	970	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	720	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CC	510	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+ AG	250	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
	230	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
	150	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CC	400	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	200	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+ ACG	130	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	430	1	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1	1
	400	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	380	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	280	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	270	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CT	250	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+TC	235	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0
	220	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	210	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	200	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	130	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	120	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
	>1000	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CT	650	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+ GT	600	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
	460	1	1	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CT	>1000	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	850	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+	660	1	1	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1

ACG	640	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
	380	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	370	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	120	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
	>1000	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	>1000	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	>1000	1	0*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	420	1	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ CT	400	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+ CCT	350	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	280	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	270	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	250	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
	220	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0
	170	1	1	1	1	0*	1	1	1	1	1	1	1
	>1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0
	>1000	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	>1000	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
Eco-RI: Core+ Enz+ GC	410	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
	400	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
*Tru*9I: Core+ Enz+ GT	160	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	140	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0
Eco-RI: Core+ Enz+ CAC	750	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Tru9I: Core+ Enz+ AG	340	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1

سپاسگزاری

این پژوهش با پشتیبانی مالی گروه کشاورزی ومنابع طبیعی جهاد دانشگاهی انجام یافت.

منابع

۱- فارسی م. و گردان ح.ر. ۱۳۸۱. تولید اسپاون هیبرید در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید، *Agaricus bisporus*، به منظور افزایش عملکرد. مجله علوم و صنایع کشاورزی، جلد ۱۶، شماره ۱، ص. ۱۳۳- ۱۲۵.

۲- فارسی م. و ذوالعلی ج. ۱۳۸۲ . "اصول بیوتکنولوژی گیاهی" (ترجمه). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۹۵ ص.

۳- فارسی م. و گردان ح.ر. ۱۳۸۶. "پرورش واصلاح قارچ‌های خوراکی با تاکید بر قارچ دکمه‌ای سفید". انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۱۴۸ ص.

۴- گردان ح.ر. خاتمی راد ذوالعلی ج. و محمودنیا م. ۱۳۸۵. آمیزش جنسی در بین هموکاریون‌های قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* به منظور تولید ژنوتیپ‌های هیبرید با عملکرد بالا. طرح پژوهشی جهاد کشاورزی کد ۵۵-۸۲۲.

۵- گردان ح.ر. خاتمی‌راد م.، ذوالعلی ج. و فارسی م. ۱۳۸۶ . معرفی و ثبت سه نژاد اصلاح شده از قارچ خوراکی دکمه‌ای، *Agaricus bisporus*. مجله دانش کشاورزی، جلد ۱۷، شماره ۲، ص. ۱۸۸- ۱۷۱.

۶- گردان ح.ر.، ذوالعلی ج.، محمودنیا م.، خاتمی م. و فارسی م. ۱۳۸۶. بررسی نشانگر AFLP در تعیین انگشت‌نگاری ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی قارچ خوراکی دکمه‌ای. مجله علوم و صنایع کشاورزی. در دست چاپ.

7- Calvo-Bado L.,. Noble R., Challen M., Dobrovin-Pennington A., and Elliott T. 2000. Sexuality and genetic identity in the *Agaricus* section *Arvenses*. Applied and Environmental Microbiology, 66:728-734

8- Cullings KW. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. Molecular Ecology, 1:233-240.

9- Doyle J.J, and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19:11-15.

10- Li R.C. 2001. Analyses on genetic diversity of Agaricus bisporus. ACTA BOTANICA YUNNANICA, 23:444-450.

11- Kwon K.W., Kong W.S., Cho Y.H., Jang K.Y., Choi S.K., Kim G.H., Yoo Y.B., and Shin H.D. 2004. Identification of commercial Oyster mushroom (*Pleurotus streatus*) strains by DNA profiles in Korea. Online at: http://knoledge.biotech.or.th/doc_upload/200412314621.doc

12- Md. Mahmud A., Kitaura H., Masaki F., and Yamada A. 2007. AFLP analysis for examining genetic differences in cultivated strains and their single-spore isolates and for confirming successful crosses in (*Agaricus blazei*). Mycoscience, 48:297-304.

13- Muller U.G., and Wolfenbarger L.L.R. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. TREE, 14:389-394.

14- Sanguinetti C., J. Dias Neto, E. and Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products seprated on polyacrylamide gels. Biotechniqes, 17:915-919.

15- Soltis Lab CTAB DNA Extraction Protocol. 2002. The Soltis Lab, Florida Museum of Natural History, on line at: http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab

16- Terashima K., and Matsumoto T. 2004. Strain typing of shiitake (*Lentinula edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat-dried fruiting body. Mycoscience, 45:79-82.

17- Terashima, K., T. Matsumoto, E. Hayashi, and Y. Fukumasa-Nakai. 2002. A genetic linkage map of *Lentinula edodes* (Shiitake) based on AFLP markers. Mycological Research, 106:911-917.

18- Urbanelli S., Rosa V., Punelli F., Porretta D., Reverberi M., Fabbri A., and Fanelli C. 2007. DNA-fingerprinting (AFLP and RFLP) for genotypic identification in species of the *Pleurotus eryngii* complex. Applied Microbiology and Biotechnology. 74:592-600.

19- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de 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 Research, 23:4407-4414.

20- Yadav M., Sharma C., Singh R.K., and Mohapatra SK. 2006. Molecular differentiation of sexually incompatible strains of *Agaricus bitorquis* using RAPD and AFLP markers. Plant Biochemistry and Biotechnology, 15:2.

21- Zhuo Y., Tan Q., Chen M-J., Cao H., Jia Y-N., and Pan Y-J. 2006. AFLP analysis of genetics diversity in main cultivated strains of *Lentinula edodes*. Mycosystema, 25:203-210.

Journal of Plant Protection
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, p. 58-67

مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸، ص ۶۷-۵۸

Preparation of AFLP Mediated-Molecular Certificate for 12 Bred Strains of the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*

P. Ghorbani Faal[1] - M. Farsi[2]* - H.R. Pourianfar[3] - M. Mahmoodnia - M[4] - J. Zolala[5]

Abstract

As hybrid spawn is propagated asexually in edible mushrooms, producers may propagate it without the permission of the owner. For the protection of the owner right, there is a great need for a molecular certificate for each commercial line. The high-resolution genotyping method of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis was used to prepare molecular certifications and fingerprinting of 12 lines of *Agaricus bisporus*. AFLP templates were prepared by digestion of *Agaricus* DNA with *Eco*RI and *Tru*9I restriction endonucleases and subsequent ligation of corresponding site specific adaptors. A total of 54 polymorphic bands were obtained using eight primer combinations. The largest polymorphic bands (12) were produced by using (E-CT/t-TC) primer combination. Molecular certificates were adjusted through presence (1) and non-presence (0) of polymorphic bands. The 12 Button Mushroom lines were distinctly allocated into three clusters with UPGMA method. These results indicated that AFLP is a fast, highly discriminating and reproducible DNA fingerprinting method in distinguishing bred lines of white button mushroom.

Key words: Button Mushroom, Bred Lines, Primer Combinations, AFLP, Molecular Certificates

1- Msc student of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Professor in Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
(*- Corresponding author E-mail: mfarsi@yahoo.com)
3- Faculty Member of The Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad Branch, The Research Group of Industrial Fungi Biotechnology
4,5- PhD students of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad