بررسی قابلیت نشانگر مولکولی AFLP در تعیین انگشت نگاری ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی قارچ خوراکی دکمه‌ای*Agaricus bisporus*

حمید رضا گردان*- محسن محمودنیا میمند- جعفر ذوالعلی- مهشید خاتمی‌راد- محمد فارسی[1]

چکیده

ظرفیت پایین اصلاحی و مشکل ثبت نژادهای تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای، چالش‌های مهمی هستند که اصلاحگران با آن روبرو می‌باشند. برای رفع مشکل ثبت نژادها، انگشت نگاری ژنتیکی با استفاده از نشانگر AFLP می‌تواند راه حل مناسبی تلقی گردد. لذا در این پژوهش، قابلیت نشانگرهای AFLP در انگشت نگاری ژنتیکی نژادهای اصلاح شده قارچ دکمه‌ای، مورد بررسی قرار گرفت و شرایط آزمایشگاهی آن بهینه‌سازی شد. الگوهای باندی AFLP برای نه دورگ بدست آمده از یک برنامه اصلاحی، تهیه شد. رتبه‌بندی بصورت شمارش نشانگرهای تک شکل و چند شکل انجام شده و داده‌های حاصله، طبق فرمت نرم افزار Pop Gene 32 برای نشانگرهای غالب، به نرم افزار مزبور داده شد. سپس ماتریس شباهت از نرم افزار Pop Gene 32 به برنامه JMP 4 وارد شد و دندروگرام در این نرم افزار رسم گردید. در مجموع ۵۵ باند قابل رتبه‌بندی تشخیص داده شد که ۲۰ ٪ آن‌ها، چند شکل و ۸۰ ٪ تک شکل بودند. تکرار آزمایش مشابه نشان داد الگوهای مزبور تکرارپذیر و قابل اطمینان می‌باشد. همچنین دندورگرام سه گروه مجزا را در ضریب شباهت ۸۰ درصد نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت که AFLP ابزاری قدرتمند برای انگشت‌نگاری ژنتیکی نژادهای قارچ خوراکی دکمه‌ای است، چراکه در این پژوهش توانستیم با بررسی چند شکلی در یک مکان نشانگری AFLP (تنها با یک جفت آغازگر)، افراد را بطور کامل از یکدیگر تفکیک نماییم.

واژه های کلیدی: قارچ دکمه‌ای، AFLP، انگشت نگاری ژنتیکی، شناسنامه مولکولی

مقدمه

اگرچه قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) بیشترین سهم را در تولید جهانی قارچ‌های خوراکی دارد، رفتار ویژه این قارچ در طی چرخه زندگی آن، همواره به عنوان یک چالش در برنامه‌های اصلاحی مطرح بوده است. تمامی واریته‌های تجاری این قارچ، *A. bisporus* var. bisporus، از چرخه زندگی اینترامیکسیس[2] پیروی می‌کنند. در نتیجه نزدیک به ۹۰ ٪ از بازیدیوسپورها (بعنوان نتاج یک چرخه جنسی) در بیشتر مکان‌های ژنی مانند والدین خود و هتروآلل (به‌دلیل نرخ پایین کراسینگ آور و سایر عوامل ایجاد تنوع کرموزومی) می‌باشند و دو سری از

۱. به ترتیب اعضای هیات علمی جهاد دانشگاهی مشهد (گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ های صنعتی)، دانشجویان دکتری بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، عضو هیات علمی جهاددانشگاهی مشهد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

*. نویسنده مسئول E-mail: hrgordan@gmail.com

2. Intramicsis

Archive of SID

www.SID.ir

کرموزوم‌های همولوگ را به ارث می‌برند (۹،۱۰). یکی از نتایج این رفتار ویژه آن است که ظرفیت اصلاحی نژادهای تجاری پایین بوده و لذا تاکنون غیر از دو نژاد معروف دورگ U1 و U3 (۷،۶،۵)، نژاد دورگ دیگری تولید نشده است. از سویی، بدلیل تنوع کم ژنتیکی در میان نژادهای تجاری، تهیه یک شناسنامه منحصر به‌فرد برای هر نژاد تجاری و ثبت نژادهای اصلاح شده دشوار می‌باشد. این مشکلات و موانع غالبا به ماهیت گونه *A. bisporus* برمی‌گردد و در این زمینه روش‌های معمول اصلاحی چندان کارآمد نیستند.

با پیدایش زیست فناوری در اوایل دهه ۱۹۸۰، راهکارهای اصلاحی این قارچ نیز به‌تدریج تغییر و بهبود پیدا کرد. تجزیه و تحلیل آیزوزایمی در اوایل دهه ۱۹۸۰ (۱۵، ۲۰، ۲۱)، توسعه نشانگرهای RFLP در اواخر دهه ۱۹۸۰ (۴) و RAPD در اوایل دهه ۱۹۹۰ (۱۱) از جمله راهکارهایی بودند که در عرصه اصلاح مولکولی قارچ خوراکی تکمه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. این نشانگرها در تایید و توسعه تئوری‌های مربوط به چرخه‌ی زندگی و جنسیت، شناسایی و جداسازی هموکاریون‌ها، مطالعه چند شکلی و تنوع ژنتیکی (۱۴،۱۷)، ترسیم نقشه ژنتیکی (۱۰)، تعیین موقعیت ژن مسئول تیپ آمیزشی (۲۵)، بررسی توارث DNAی میتوکندریایی (۷) و بسیاری دیگر از جنبه‌های زیست مولکولی یا اصلاحی قارچ *A. bisporus* موثر بودند. اما هیچ کدام از این نشانگرها قابلیت استفاده در انگشت نگاری ژنتیکی نژادها را بصورت آسان و کم‌هزینه نداشته‌اند. انگشت نگاری ژنتیکی می‌تواند اساسی برای تهیه شناسنامه مولکولی منحصر به‌فرد برای هر نژاد اصلاحی و کسب حق مالکیت معنوی برای آن باشد. این مساله جدا از اهمیت علمی، از حیث اقتصادی نیز برای مراکز تحقیق و توسعه که بر روی اصلاح نژاد کار می‌کنند، حایز اهمیت است (۱۲).

تکثیر رویشی یک نژاد اصلاحی، نسبتا ساده و امری متداول است و در حال حاضر برای مراکز تحقیقات نژادی قارچ دکمه‌ای، هیچ راهکار قانونی و علمی برای اثبات ادعای تکثیر غیر مجاز نژادها وجود ندارد. از اواسط دهه ۱۹۹۰، فن AFLP[1] معرفی شد که نسبت به نشانگرهای RAPD بیشتر قابل اطمینان بوده و از نشانگرهای RFLP ساده‌تر می‌باشد و می‌تواند در زمان نسبتا کوتاهی صدها باند نشانگر حاوی اطلاعات مفید تولید نماید (۲۳،۲۴). روش AFLP در اصل، امکان تشخیص چند شکلی قطعات برشی ژنومی را توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز فراهم می‌آورد (۱۶). نشانگرهای AFLP این ظرفیت را دارند که تفاوت‌های ژنتیکی را در سطح DNA آشکار سازند. لذا قابلیت نشانگرهای AFLP در انگشت نگاری ژنتیکی نژادهای قارچ تکمه‌ای حایز اهمیت است. گزارشات متعددی در مورد استفاده از AFLP در سامانه‌های قارچی و میکروبی در دست است، از جمله: تعیین نژاد در گونه‌های *Suillus pungens* و *Amanita francheti* (که دارای اندام ماشروم هستند) (۲،۱۸)، تعیین نژاد در قارچ بیمارگر معروف *Trichoderma spp.* (۴) و مطالعه فیلوژنی گونه‌های جنس *Fusarium* (۲). اما تاکنون کمتر گزارشی در مورد استفاده از نشانگرهای AFLP در قارچ‌های خوراکی منتشر شده است و حتی به‌نظر می‌رسد تحقیقی در مورد استفاده از این نشانگرها به‌ویژه در قارچ دکمه‌ای منتشر نشده است. این پژوهش در حقیقت بخشی از یک برنامه اصلاحی برای تهیه ژنوتیپ‌های مطلوب با عملکرد بالا بود که برای اولین بار (حداقل در کشور) این امکان را فراهم نمود که نقش نشانگرهای AFLP در انگشت نگاری ژنتیکی نژادهای اصلاح شده قارچ دکمه‌ای مورد بررسی قرار گرفته و شرایط آزمایشگاهی آن بهینه سازی شود.

1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول(۱) مشخصات و ویژگی‌های چهارده نژاد مورد استفاده در آزمون AFLP

ردیف	نژاد	فرمول میسلیومی	ردیف	نژاد	شجره میسلیومی
۱	IM-001	MSL-U1--2 × AU3--30	۸	IM-009	B--2 ×MC376--43
۲	IM-002*	MSL-U1--12 × MC376--11	۹	Holland 737	-
۳	IM-003*	MSL-U1--6 × MSL-U1--13	۱۰	IM-H-002	B--2
۴	IM-004	MC378--53× AU3--21	۱۱	IM-H-030	Holland 737--30
۵	IM-005	MSL-U1--8 × MSL-U1--2	۱۲	IM-H-053	MC378--53
۶	IM-007	130--7 × Holland 737--43	۱۳	IM-037.1	MSL-U1--9 × MC376--43
۷	IM-008*	MC378--59× (MC378-53 MC392-17) --4	۱۴	IM-125	(MC378-53 × MC392-17)--6× MC378--53

توضیحات جدول- ردیف‌های ۸-۱ دورگ‌هایی هستند که پس از آزمون مقدماتی عملکرد بـه آزمـون‌هـای ناحیـه‌ای عملکـرد بـرده شـدند. نژادهـای ستاره‌دار آنهایی هستند که پس از آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، اختلاف بسیار معنی‌داری (۱٪) با نژاد شاهد نشان دادند و بعنوان دورگ‌هـای اصـلاح شده، حق ثبت اختراع دریافت نمودند (گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، ۱۳۸۵). نژاد Holland 737 یکی از نژادهای وارداتی رایج در صنایع پرورش قارچ ایران است.ردیف‌های ۱۲ -۱۰ هموکاریون و ردیف ۱۴-۱۳ در زمره دورگ‌هایی هستند که در آزمون مقدماتی عملکرد تایید نشدند

مواد و روش‌ها

تهیه نژاد- ابتدا ۱۴۵ نژاد دورگ از تلاقی ۲۹ هموکاریون بدست آمد. دورگ‌ها ابتدا در آزمون مقدماتی عملکرد (در یک واحد صنعتی پرورش قارچ) بر اساس یک طرح کاملا تصادفی مورد گزینش قرار گرفته و ۹ دورگ برتر از لحاظ عملکرد نسبت به شاهد (در سطح ٪ ۵) به آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد برده شدند. این آزمون‌ها در دو واحد صنعتی پرورش قارچ بر اساس یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شدند. چهارده نژاد مورد استفاده در آزمایشات AFLP از برنامه‌ی اصلاحی فوق انتخاب شدند (۱). در جدول ۱ نژادهای ردیف ۹-۱ به‌منظور ارزیابی قابلیت AFLP در انگشت نگاری ژنتیکی و سایر نژادها برای ارزیابی قابلیت AFLP در تمایز هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها مورد استفاده قرار گرفتند (جزئیات ارایه نشده است).

جداسازی DNAی ژنومی- از روش تغییر یافته سانگ[1] و همکاران (۲۰۰۰) برای جداسازی DNAی ژنومی استفاده شد. بطور خلاصه، میسلیوم کشت جامد دو هفته‌ای هر نمونه توسط نیتروژن مایع پودر و سپس ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (pH = ۸، ۴۰ mM EDTA و ۱۰۰ mM TRIS) و ۶۰ میکرولیتر محلول ۱۰٪ SDS به هر نمونه اضافه شد. پس از مراحل مختلف سانتریفوژ، تهیه لایه آبکی و رسوب DNAی ژنومی، رسوب نهایی با اتانول ۷۰ ٪ شستشو داده شده و در ۵۰ میکرولیتر از بافر 1x TE حل شد. نمونه‌ها تا زمان مورد استفاده، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمایشات AFLP (واکنش‌های برش، اتصال و تکثیر)- برای واکنش برش، محلول واکنش ۵۰ میکرولیتری حاوی ۵۰۰ نانوگرم DNAی ژنومی، ۵ میکرولیتر بافر OPA، ۵ واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Tru*91 و ۳۹ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده سترون در دمای ۳۷ درجه

1. Song

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌گراد به مدت ۸-۷ ساعت قرار داده شد. واکنش‌های اتصال با استفاده از رابط‌های[1] زیر (از سینتول[2] روسیه) و پس از دو رشته‌ای کردن آنها انجام شد. برای انجام واکنش‌های اتصال، هر نمونه ۴۵ میکرولیتری حاوی ۴۰ میکرولیتر قطعات DNAی برش خورده، ۵ پیکومول رابط دورشته‌ای مربوط به *Eco*RI، ۵۰ پیکومول رابط دو رشته‌ای مربوط به *Tru*9I، یک میکرولیتر بافر OPA،

*Eco***RI**-Adapter1:
5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′
*Eco***RI**-Adapter2:
5′-AATTGG TACGCAGTCTAC-3′
*Tru***9I**-Adapter1: 5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′
*Tru***9I**-Adapter2: 5′-TACTCAGGACTCAT-3′

۲ میلی‌مولار ATP، یک واحد از هرکدام از دو آنزیم برشی و یک واحد T4 DNA Ligase در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار گرفت. برای انجام واکنش‌های تکثیر پیش انتخابی، آغازگرهای پیش انتخابی زیر (از سینتول) مورد استفاده قرار گرفتند. باز A در **Eco**RI و باز C در *Tru***9I** بعنوان بازهای انتخابی بکار رفتند.

*Eco***RI**-Primer1 (پیش انتخابی):
5′-GACTGCGTACCAATTCA-3′
*Tru***9I**-Primer1 (پیش انتخابی):
5′-GATGAGTCCTGAGTAAC-3′

اجزای یک محلول ۲۵ میکرولیتری عبارت بودند از ۴ میکرولیتر DNAی ۵ برابر رقیق شده حاصل از مرحله اتصال، ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای پیش انتخابی، یک برابر بافر PCR (از سیناژن)، ۲ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (از سیناژن)، یک واحد تک پلی‌مراز (از سیناژن) و ۱۴/۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده سترون. واکنش (در دستگاه چرخه حرارتی Biometra مدل T Gradient) ابتدا در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه شروع شده و سپس در طی ۳۰ چرخه شامل ۹۴ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد، هر کدام به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه ادامه یافته و در نهایت به ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه خاتمه یافت. در واکنش‌های تکثیر انتخابی، آغازگرهای انتخابی زیر (از سینتول) استفاده شدند. بازهای AC در ***Eco*RI** و بازهای CC در ***Tru*9I** بعنوان بازهای انتخابی بکار رفتند.

*Eco***RI**-Primer2 (انتخابی):
5′-GACTGCGTACCAATTCAC-3′
*Tru***9I**-Primer2 (انتخابی):
5′-GATGAGTCCTGAGTAACC-3′

محلول ۲۰ میکرولیتری واکنش متشکل از ۳ میکرولیتر DNAی ۲۰ بار رقیق شده حاصل از تکثیر پیش انتخابی، ۵۰ نانوگرم از هر کدام از آغازگرهای انتخابی، یک برابر بافر PCR (از سیناژن)، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl2، ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (از سیناژن)، یک واحد تک پلی‌مراز (از سیناژن) و ۱۱/۳ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده سترون بود. واکنش ابتدا در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه شروع شده و سپس طی ۱۳ چرخه $94^{\circ}c$ (۳۰ ثانیه)، $63^{\circ}c$ (۳۰ ثانیه) و $72^{\circ}c$ (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتی‌گراد از دمای اتصال کاهش یافت و ۲۳ چرخه دیگر $94^{\circ}c$ (۳۰ثانیه)، $54^{\circ}c$ (۳۰ ثانیه) و $72^{\circ}c$ (۶۰ ثانیه) ادامه یافته و نهایتا در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه خاتمه یافت (واس و همکاران، ۱۹۹۵ و عبدالستار و همکاران، ۲۰۰۳).

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی- محصولات تکثیری روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشت ۷٪ در دستگاه الکتروفورز عمودی مدل S2001 از شرکت Life Technologies™ با استفاده از یک محلول ۱۱۰ میلی‌لیتری ژل حاوی ۵۰ گرم اوره، ۱۱ میلی‌لیتر TBE پنج برابر، ۱۹/۲۵ میلی‌لیتر محلول اکریلامید ۴۰٪ (۱۹:۱)، تا حجم ۱۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر شده سترون، همراه با ۷۵۰ مایکرولیتر آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد و ۱۵۰ مایکرولیتر تمد مشاهده شد. ابتدا الکتروفورز مقدماتی[3] (بدون نمونه‌گذاری) و سپس

1. Adapters
2. Syntol
3. Pre-run

Archive of SID

www.SID.ir

الکتروفورز اصلی در ولتاژ ثابت ۵۰۰ ولت، مدت زمان ۳۰۰ دقیقه و دمای ژل ۵۰- ۴۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. از یک نشانگر اندازه[1] با ۱۳ باند از ۵۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز که ۱۲ باند آن قابل مشاهده و رتبه‌بندی از ۱۰۰ تا بالای ۱۰۰۰ جفت باز بود، استفاده شد. به‌منظور مشاهده باندها، از یک روش تغییر یافته رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده گردید (جستین[2] و همکاران، ۱۹۹۰). این روش به طور خلاصه شامل مراحل تثبیت (۴۰ میلی‌لیتر اتانول مطلق به اضافه ۲ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۰۰٪ تا حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، رنگ آمیزی (۰/۶ گرم نیترات نقره تا حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر)، آبشویی، ظهور (۶ گرم سود به اضافه ۱/۸ میلی‌لیتر فرمالدهید تا حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و تثبیت بود. به‌منظور تایید یکنواخت بودن الگوهای باندی، هر آزمایش دو بار تکرار شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها- تعداد کل نشانگرها بصورت نشانگرهای تک شکل و چند شکل شمارش شدند. علامت 1 برای حضور باند و علامت 0 برای عدم حضور باند در نظر گرفته شد. برای تجزیه کلاستر، داده‌ها به نرم افزار Pop Gene 32 برای نشانگرهای غالب، داده شدند. ماتریس شباهت از نرم افزار Pop Gene 32 به برنامه JMP 4 وارد شد و دندروگرام با استفاده از روش آشیانه‌ای مدل WARD و بر اساس بیشترین شباهت رسم گردید.

نتایج و بحث

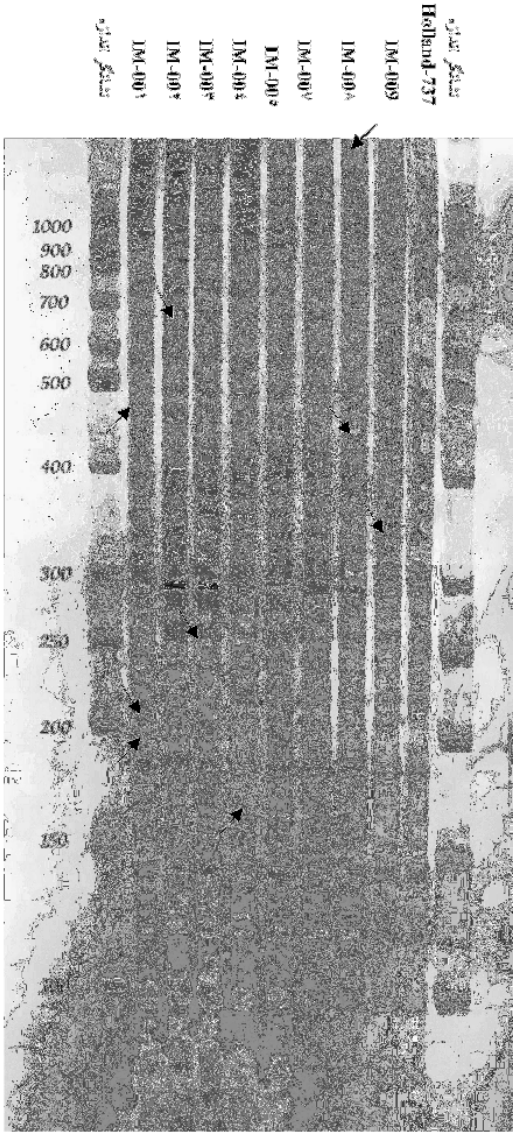
چند شکلی AFLP و تجزیه کلاستر- پس از انجام الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی با نیترات نقره، الگوهای باندی ۱۴ نمونه تهیه و رتبه‌بندی شد. یکی از آزمایشات بر روی ۶ نژاد (با هدف ارزیابی قابلیت AFLP در نشان دادن تمایز بین هموکاریون‌ها و هتروکاریون‌ها) و دیگری بر روی ۹ نژاد (با هدف انگشت نگاری ژنتیکی نژادهای اصلاح شده) انجام شد. در مجموع ۹۳ باند برای ۱۴ نژاد تشخیص داده شد که تقریبا ۲۳/۵ درصد آنها چند شکل بودند. در آزمایش اخیر بر روی ۹ نژاد، با استفاده از یک مکان نشانگری مورد برش (با یک جفت آغازگر)، ۵۵ باند قابل رتبه‌بندی در دامنه ۱۰۰ تا بالاتر از ۱۰۰۰ جفت باز تشخیص داده شد که ۱۱ باند چند شکل و ۴۴ باند تک شکل بودند (شکل ۱). علیرغم محاسبه باندهای بالای ۱۰۰۰ جفت باز در چند شکلی، استدلال این بود که این باندها احتمالا در اثر برش ناقص آنزیمی بوجود آمده بودند و لذا باندهای موثر و معنی‌دار در دامنه ۱۵۰ تا ۷۰۰ در نظر گرفته شدند. تکرار آزمایشات نشان داد که الگوهای مزبور تکرار پذیر و قابل اطمینان بودند. همچنین دندروگرام مربوطه، ۳ گروه مجزا را در درجه شباهت ۸۰ درصد نشان داد (شکل ۲).

باندهای منحصر به‌فرد و ارزش اصلاحی آنها- الگوی باندی AFLP برای ۹ نژاد، چند شکلی قابل ملاحظه‌ای نشان داد، بطوریکه فقط با یک مکان نشانگری (یعنی فقط با یک ترکیب جفت آغازگری)، ۲۰٪ چندشکلی بدست آمد. در برخی موارد، وجود یا عدم وجود یک باند برای یک نژاد، منحصر به فرد بود. نژاد IM-002 بصورت اختصاصی فاقد باند به وزن ۶۲۰ جفت باز بود. این نژاد در آزمایشات ناحیه‌ای عملکرد، عملکردی بالاتر از نژاد شاهد (نژاد 512) و بیشتر از سایرین (به جز نژادهای IM-003 و IM-008) در سطح ۱٪ نشان داد (جدول ۱). در وزن ۴۸۰ جفت باز، نژاد IM-001 بطور اختصاصی دارای باند و در وزن ۲۲۰ جفت باز، بطور اختصاصی فاقد باند بود. عملکرد این نژاد در آزمون مقدماتی عملکرد، بالاتر از نژاد شاهد بود (۵٪) اما در آزمایشات ناحیه‌ای عملکرد، بعنوان یک نژاد برتر محسوب نشد (جدول ۱). در وزن ۴۵۰ جفت باز، نژاد IM-008 بصورت منحصر به‌فردی فاقد باند بود. این نژاد در آزمون‌های مقدماتی و ناحیه‌ای عملکرد رتبه اول را داشته و

1. Size marker
2. Jestin

Archive of SID

www.SID.ir



شکل (۱) نیمرخی از قطعه ژل AFLP مربوط به ۹ نژاد از قارچ *Agaricus bisporus*. فلش‌های سیاه رنگ، در هر وزن باندی، نمونه‌ای از آلل‌های چند شکل را نشان می‌دهند.

میانگین عملکرد آن بیشتر از شاهدها (آزمون مقدماتی و آزمون ناحیه‌ای) و همچنین اختلاف میانگین عملکرد این دورگ با سایرین بسیار معنی‌دار بود (جدول ۱). این نژاد بعنوان بهترین نژاد اصلاحی (از لحاظ عملکرد و ثبات رشد میسلیومی و تا حدودی از لحاظ کیفیت اقتصادی هنگام برداشت) محسوب شده و لذا الگوی منحصر به‌فرد باندی آن حایز اهمیت بسیاری است (۱). الگوی باندی نژادهای مورد آزمایش نشان داد که تنها نژادهای IM-007 و Holland 737 دارای یک الگوی باندی یکسان در حد فاصل ۱۰۰ تا بالای ۱۰۰۰ جفت باز بودند (شکل‌های ۱ و ۲). سایر نژادها هر کدام دارای یک الگوی باندی متمایز در حد فاصل ۱۰۰ تا بالای ۱۰۰۰ جفت باز بودند. مجموع این مشاهدات نشان می‌دهد که استفاده از فناوری AFLP می‌تواند منجر به تولید چند شکلی قابل ملاحظه‌ای در نژادهای مورد آزمایش و در نتیجه تولید یک الگوی باندی منحصر به فرد برای هر نژاد اصلاحی شود.

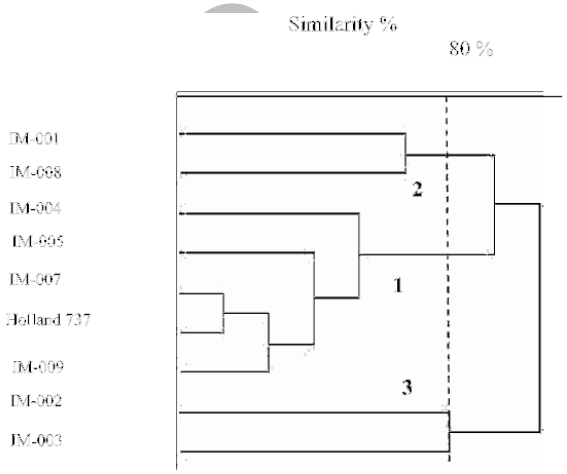
این فناوری همچنین می‌تواند در برخی نژادهای اصلاحی، حضور یا عدم حضور آلل‌های منحصر به فردی را نشان دهد. بعلاوه، نتایج بدست آمده قابل اطمینان و تکرار پذیر می‌باشند. این یافته‌ها هنگامی بیشتر اهمیت می‌یابد که در نظر بگیریم که تنوع ژنتیکی نژادهای تجاری در قارچ دکمه‌ای بسیار اندک است (۱۱). در این پژوهش، تعداد بازهای قابل انتخاب در هر کدام از دو آغازگر **EcoRI** و **MseI**، یک عدد بود و لذا در مجموع، ۱۶ انتخاب داشتیم که تنها یک ترکیب از این ۱۶ انتخاب، مورد استفاده قرار گرفت (به‌عبارتی فقط یک مکان آللی نشانگری مورد آزمایش قرار گرفت). با وجود قابلیت بالای AFLP در تهیه الگوهای باندی، چنانچه از ترکیبات بیشتری (حداقل ۱۰ ترکیب آغازگری) استفاده شود، تعداد باندهای چند شکل بیشتر و همچنین باندهای منحصر به‌فرد بیشتر و لذا تفسیر با ارزش‌تری برای هر نژاد بدست خواهد آمد.

تفسیر گروه‌بندی نژادها با توجه به زمینه شجره‌ای آنها- در گروه ۱، دو نژاد IM-007 و Holland 737 بیشترین شباهت را بهم دارند. دورگ IM-007 از تلاقی هموکاریون‌های با منشاء U1 (نژاد مادری تقریبا تمامی نژادهای تجاری در سراسر دنیا) و Holland 737 (که خود از منشاء U1 یا U3 می‌باشد و جزء نژادهای پرمحصول کشور محسوب

Archive of

www.SID.ir

می‌گردد) بدست آمده است (جدول ۱). علیرغم اینکه والدین این دورگ جزء نژادهای پرمحصول می‌باشند، اما رتبه عملکرد این دورگ در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، هفتم و کمتر از شاهد بود. عملکرد سایر نژادهای قرار گرفته در گروه ۱ در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، از نژاد شاهد کمتر بود. لذا به نظر می‌رسد قرار گرفتن نژادها در گروه ۱ متناظر با زمینه اصلاحی و شجره‌ای آنها می‌باشد.



شکل (۲) گروه‌بندی ۹ نمونه با توجه به الگوهای باندی AFLP بـه روش Ward

در گروه ۲، دورگ‌های IM-001 و IM-008 قرار گرفتند. از لحاظ شجره‌ای، نژاد IM-001 از تلاقی هموکاریون‌های AU3(با منشاء U3) و MSL-U1 (با منشاء U1) تولید شده است (جدول ۱). رتبه عملکرد آن در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، چهارم و کمتر از شاهد بود. دورگ IM-008 یک دورگ با منشاء U1 بود. یکی از والدین هموکاریوتیک این دورگ از یک نژاد اصلاح شده در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بدست آمده بود (MC378-53 × MC392-17). این نژاد در آزمون‌های مقدماتی و ناحیه‌ای عملکرد رتبه اول را داشته و میانگین عملکرد آن بیشتر از شاهدها و همچنین اختلاف میانگین عملکرد این دورگ با سایرین بسیار معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد از یک سو در گروه دوم قرار گرفتن این دو نژاد تا حدودی نشان دهنده اختلاف زمینه اصلاحی آنها باشد. اما از سوی دیگر، در یک گروه قرار گرفتن این دو نژاد، چندان ارتباطی با زمینه اصلاحی آنها نداشته باشد و بیشتر بدلیل الگوهای باندی خاص آنها باشد.

در گروه ۳، نژادهای IM-002 و IM-003 قرار دارند. نژاد IM-002 از تلاقی هموکاریون‌های MC376 (با منشاء U1) و MSL-U1 (با منشاء U1) تولید شده است (جدول ۱). رتبه عملکرد آن در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد، سوم و بیشتر از شاهد بود. همچنین اختلاف میانگین عملکرد این دورگ با سایرین (به‌جز نژادهای IM-002 و IM-008) بسیار معنی‌دار بود. والدین هموکاریون دورگ IM-003 هر دو از منشاء U1 بودند. این نژاد در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد رتبه دوم را داشته و میانگین عملکرد آن بیشتر از شاهد و همچنین اختلاف میانگین عملکرد این دورگ با سایرین (به‌جز نژاد IM-008) بسیار معنی‌دار بود. نژادهای IM-002 و IM-003 (به همراه نژاد IM-008) جزء نژادهای اصلاحی تایید شده در آزمون‌های ناحیه‌ای عملکرد بودند. لذا به نظر می‌رسد گروه ۳ به روشنی توانسته است زمینه اصلاحی و شجره‌ای نژادها را با گروهبندی بر اساس الگوهای نشانگری AFLP مطابقت دهد. اما از سوی دیگر، علیرغم زمینه مشابه اصلاحی، این دو نژاد در سومین گروه شباهت قرار گرفتند.

در مجموع، این پژوهش به‌خوبی نشان داد که فن AFLP با توجه با قابلیت بالای خود در پوشش گسترده تنوع ژنومی و تولید چند شکلی بالا، می‌تواند نوید بخش تهیه شناسنامه مولکولی منحصر به فرد برای هر نژاد اصلاحی باشد. اما دندروگرام شباهت نتوانست به‌روشنی در تمامی موارد، ارتباط گروه‌بندی را با زمینه اصلاحی و شجره‌ای نژادها توضیح دهد. این امر ممکن است با افزایش تعداد نژادها و استفاده از چند ترکیب جفت آغازگری (حداقل ۱۰ ترکیب) محقق شود.

Archive of SID

www.SID.ir

نشانگرهای AFLP قابلیت بالایی در سه عرصه مختلف اصلاح قارچ دکمه‌ای دارند: (۱) انگشت نگاری ژنتیکی و تهیه شناسنامه مولکولی منحصر به‌فرد برای هر نژاد (۲) تمایز جمعیت‌ها (۳) نقشه‌یابی صفات کمی. این پژوهش اساسی است تا در تحقیقات آتی، استفاده از AFLP در برنامه‌های اصلاح مولکولی قارچ دکمه‌ای در سه عرصه یاد شده توسعه یابد.

سپاسگزاری

این پژوهش با پشتیبانی مالی گروه کشاورزی و منابع طبیعی جهاد دانشگاهی انجام شد. از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مدیریت شرکت‌های کشت و صنعت قارچ پویا پاژ و خوراک طلایی مشهد، نشاط بیرجند و جلگه دز دزفول تشکر می‌شود. از توصیه‌های ارزشمند پرفسور کریگن (از سیلون آمریکا) و پرفسور هورگن (از دانشگاه تورنتو) قدردانی می گردد.

منابع

۱. گردان ح‌ر، خاتمی‌راد م، ذوالعلی ج و فارسی م. ۱۳۸۶. معرفی و ثبت سه نژاد اصلاح شده از قارچ خوراکی دکمه‌ای، *Agaricus bisporus*. مجله علوم و صنایع کشاورزی، در نوبت چاپ

2. Abdel-Satar M, Khalil MS, Mohmed, IN, Abd-Elsalam KM, Verreet JA. 2003. Molecular phylogeny of Fusarium species by AFLP fingerprint. African Journal of Biotechnology, 2 (3): 51-55.
3. Bruns T, Tan J, Bidartondo M, Szaro T, Redecker D. 2002. Survival of Suillus pungens and Amanita francheti ectomycorrhizal genets was rare or absent after a stand-replacing wildfire. New Phytologist, 155: 517-523.
4. Buhariwalla HK, Srilakshmi P, Kannan S, Kanachi RS, Chandra S, Satyaprasad K, Waliyar F, Thakur, RP, Crouch JH. 2005. AFLP analysis of Trichoderma spp. from India compared with sequence and morphogical-based diagnostics. Journal of Phytopathology, 153: 389-400.
5. Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB. 1987. Restriction fragment length polymorphism in the mushroom *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*, Appl. Environ. Microbiol. 53: 816-822.
6. Fritsche G. 1983. Breeding *Agaricus bisporus* at the mushroom experimental station Horst. Mushroom J. 122: 49-53.
7. Fritsche G. 1991. A personal view on mushroom breeding from 1957-1991. In LJLD Van Griensven (Ed.), Genetics and Breeding of Agaricus: 3-20. Pudoc.
8. Horgen PA, Castle A. 2002. The application and potential of molecular approaches to mushrooms. In: Kempken. ed. The Mycota XI: Agricultural Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 2-17.
9. Jestin A, Blanchard P, Vannier P, Garbar-Chenon A, Nicolas JC. 1990. Silver staining of DNA restriction fragments for the ultra rapid identification of pseudorabies virus strains. Biologicals, 18: 295-300.
10. Kerrigan RW. 2000. A brief history of marker assisted selection in *Agaricus bisporus*. In: Van Griensven. ed. Science and Cultivation of Edible Fungi. Balkema, Rotterdam, ISBN 9038091430, pp. 183-189.
11. Kerrigan RW, Royer JC, Baller LM, Kohli Y, Horgen PA. 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 133: 225-236.
12. Khush RS, Becker E, Wach M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Apple. Environ. Microbiol. 58: (19) 2971-2977.
13. Loftus MG, Lodder SC, Legg EJ. 1995. Molecular mushroom breeding. In: Elliott. ed. Science and Cultivation of Edible Fungi. Balkema, Rotterdam, ISBN 9054105704, pp. 3-9.
14. Majer D, Lewis BG, Mithen R. 1998. Genetic variation among filed isolates of Pyrenopeziza brassica. Plant Pathol., 47: 22-28.

Archive of SID

www.SID.ir

15.Martin, P, Muruke, M, Hosea, K, Kivaisi A., Zerwas, N, Bauerle, C. 2004. A rapid PCR-RFLP method for monitoring genetic variation among commercial mushroom species. Biochemistry and Molecular Biology Education, 32 (6): 390-394.
16.May B, Royse D. 1982. Confirmation of crosses between lines of Agaricus brunnescens by isozyme analysis. Exp. Mycol., 6: 283-292.
17.Muller UG, Wolfenbarger LLR. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. TREE, 14: 389-394.
18.Ramirez L, Larraya LM, Pisabarro AG. 2001. Molecular tools for breeding basidiomycetes. International Microbiology, 3: 147-152.
19.Redecker D, Szaro TM, Bowman JR, Bruns TD. 2001. Small genes of lactarius zanthogalactus, Russula cremoricolor and Amanita francheti in late stage ecromycorrhizal successions. Molecular Ecology, 10: 1025-1034.
20.Rosendahl S, Taylor JW. 1997. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. Mol. Ecol., 7: 3-10.
21.Royse D, May B. 1982a. Genetic relatedness and its application to selective breeding of *Agaricus brunnescens*. Mycologia, 74: 569-575.
22.Royse DJ, May B. 1982b. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. Mycologia 74: 93-102.
23.Song S, Xu W, Zeng W, Wang Z. 2000. RAPD analysis of species diversity and genomic differences in Agaricus bisporus. In: "Science and cultivation of edible fungi". (Eds. Van Grienven). A. A. Balkema, Roterdam, The Netherland. pp. 191-200.
24.Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23 (21): 4407-4414.
25.Vos P, Kuiper M. 1997. AFLP analysis, in: DNA. markers: protocols, applications, and overviews (Caetano-Anolles G and Gresshoff PM, eds), pp. 115-131.
26.Xu JP, Kerrigan RW, Horgen PA, Anderson JB. 1993. Localization of mating type gene in *Agaricus bisporus*. Appl. Environ. Microbiol. 59(9): 3044-3049.

Archive of SID

www.SID.ir

A Study of Potential of AFLP Markers to Genetic Fingerprinting of the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*

H. R. Gordan[*] - M. Mahmoodnia-M – J. Zolala – M. Khatami-Rad – M. Farsi[1]

Abstract

The low breeding capacity and registration of commercial strains of *Agaricus bisporus* are the most important challenges for mushroom breeders. AFLP fingerprinting can be a promising solution for registration of *Agaricus bisporus* starins. This research has examined AFLPs potential to molecular breeding of *A. bisporus* with an emphasis on genetic fingerprinting of the bred strains. The AFLP band patterns of nine bred strains were prepared. Monomorph and polymorph bands were numbered and relevant data were transferred to PoPGene32 software for dominant markers. Dendrogram was drawn by using JMP4 software. Overall 55 scorable bands were identified from which 20% were poly-morph and 80% were mono-morph. The relevant dendrogram showed different three groups at a similarity coefficient of 80%. The results showed that AFLP is a potent technique for genetic fingerprinting of the button mushroom strains and also for providing a molecular certificate for each bred strain, because in this research with one marker site (only one pair of primer out of 16 possible combinations), it was possible to distinguish individuals. The result also showed that the AFLP profiling is replicable and reliable

Keywords: *the white button mushroom, AFLP*, genetic fingerprinting, molecular certificate

Archive of SID

* Coresponding authour Email: hrgordan@gmail.com

1. Contribntion from the Research Group of Industrial Fungi Biotechnology and Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

www.SID.ir