ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۳۵۲- ۳۴۳

تفکیک و شناسایی نژادهای قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، ITS و IGS

Identification and strain-typing of button mushroom using ISSR, ITS and IGS markers

خلیل ملک‌زاده*[۱]، احسان محسنی‌فرد[۲]، بنفشه جلال‌زاده مقدم شهری[۱]، محمد فارسی[۲]

۱- مربیان پژوهش، گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد
۲- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشگاه فردوسی مشهد

Malekzadeh KH*[1], Mohsenifard E[2], Jalalzadeh Moghaddam Shahri B[1], Farsi M[2]

1. Instructors, Industrial Fungi Biotechnology Research Department, ACECR, Mashhad branch
2. PhD Student, Professor, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Khalil.malekzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۹- تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

نژادهای تجاری قارچ دکمه‌ای به خاطر اینکه در طی فرایندهای اصلاحی تولید شده و منشا والدینی غالبا مشابه‌ای دارند شباهت ژنتیکی بالایی با هم دارند. شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های این قارچ می‌تواند راه‌گشای مسائل اصلاحی و ثبت مالکیت حقوقی در این قارچ باشد. امروزه روش‌های مولکولی ابزار مناسبی را جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی فراهم کرده‌اند. نشانگرهای ISSR توانایی جداسازی ژنوتیپ‌های با رابطه خویشاوندی نزدیک را دارا می‌باشد. از سوی دیگر، توالی‌های منحصر به فرد نواحی ITS و IGS ریبوزومی قارچ‌ها به منظور بررسی روابط تکاملی استفاده می‌شوند. در این مطالعه توانمندی این ابزارهای مولکولی در تفکیک ژنوتیپ‌های قارچ دکمه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. ۲۳ ژنوتیپ از سه گونه قارچ دکمه‌ای با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفتند و نواحی ITS و IGS ریبوزومی آنها نیز به کمک آغازگرهای اختصاصی تکثیر و توالی‌یابی شد. از ۲۰ آغازگر ISSR، تعداد ۱۳ آغازگر با ایجاد ۲۴۵ باند قابل امتیازدهی و ۲۴۲ باند چندشکل جهت بررسی روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها مناسب تشخیص داده شدند. کمترین ضرایب چندشکلی (۰/۹۲ و ۰/۹۵) به ترتیب به آغازگرهای ۸۴۱ و ۸۰۹ بیشترین ضریب چندشکلی (۱/۰) به ۱۱ آغازگر دیگر تعلق گرفت. کمترین و بیشترین ضریب شباهت ژنتیکی به ترتیب بین ژنوتیپ‌های P4 و Dezful با ۰/۱۰۰ و 512 و Yousefi با ۰/۹۶۱ بدست آمد. آغازگرهای ۸۰۸، ۸۰۹، ۸۴۱ و ۸۴۲ توانایی جداسازی کلیه ژنوتیپ‌ها را با وجود روابط خویشاوندی نزدیک آنها دارند. از سوی دیگر، نتایج توالی‌یابی نواحی ITS و IGS نشان داد که این نواحی علیرغم عدم قابلیت تفکیک درون گونه ای، در تفکیک بین گونه‌ای کارآمد می‌باشند. بنابراین نشانگرهای ISSR در مقایسه با نواحی ITS و IGS از قابلیت بالاتری در تفکیک ژنوتیپ‌های با رابطه خویشاوندی نزدیک در قارچ خوراکی دکمه‌ای برخوردار بوده و می‌توانند به عنوان ابزاری کارآمد در انگشت‌نگاری و ثبت حقوقی نژادهای تجاری درون یک گونه مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
قارچ خوراکی
نشانگرهای مولکولی
DNA
ITS

Archive of SID

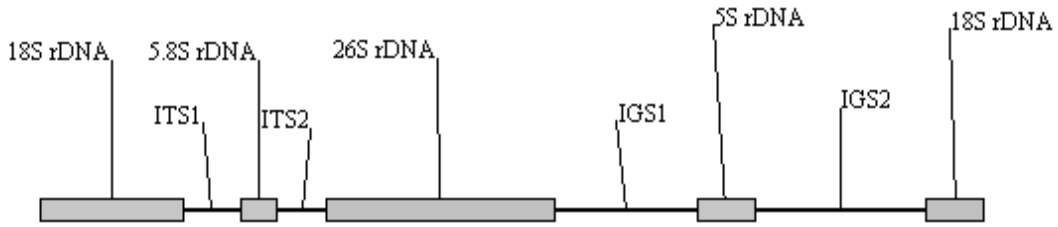
مقدمه

قارچ دکمه‌ای متعلق به شاخه *Basidomycota*، راسته *Agaricales*، خانواده *Agaricaceae* و جنس *Agaricus* است. جنس *Agaricus* یکی از جنس‌های مهم و بزرگ قارچ‌های کلاهکدار است که دارای بیش از ۳۰۰ گونه خوراکی و سمی می‌باشد. بیشتر گونه‌های این جنس غیرسمی هستند. گونه‌های *A. bisporus* و *A. campesrtris* سهم زیادی از بازار قارچ‌های خوراکی پرورشی را به خود اختصاص داده‌اند (Al-Momany and Saleh 2009). دسته‌بندی و تمایز نژادهای قارچ دکمه‌ای تجاری بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی صورت می‌گیرد، که این خصوصیات به راحتی تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند (Royse and May 1982; Guan et al.2008). اثر عوامل محیط و همچنین وجود رابطه ژنتیکی نزدیک بین اکثر نژادهای تجاری، جداسازی و شناسایی آنها را سخت و گاهی غیرممکن می‌سازد و مشکلاتی را برای اثبات متفاوت بودن نژادها برای تولید کننده‌ها و عرضه‌کننده‌ها بوجود می‌آورد (Guan et al.2008). برای رفع این مسائل معرفی روشی کارآمد و سریع برای شناسایی و تفکیک نژادهای قارچ دکمه‌ای لازم به نظر می‌رسد.

در چند دهه اخیر ابزارهای مولکولی مختلف مبتنی بر چندشکلی اسیدهای نوکلئیک در مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها استفاده شده‌اند. از تکنیک RFLP در تعیین ژنوتیپ قارچ *A. brunnesces* (Castle et al.1987)، از نشانگر RAPD در تفکیک کولتیوارهای قارچ دکمه‌ای (Moore et al. 2001)، از ITS-RFLP در تعیین ژنوتیپ قارچ‌های جنس *Pleurotus* (Ma and Luo 2002)، از تجزیه و تحلیل نواحی ITS و IGS در بررسی تنوع قارچ‌های جنس *Armillaria* (Chillali et al. 1998)، از نشانگر ISSR در تعیین نوع نژاد در قارچ *Shiitake* (Zhang et al. 2007) و برای جداسازی گونه و نژادهای قارچ دکمه‌ای (Guan et al. 2008) و از نشانگر AFLP جهت تهیه شناسنامه مولکولی نژادهای قارچ دکمه‌ای سفید (Ghorbani Faal et al. 2009) استفاده کرده‌اند. نشانگر ISSR یکی از ابزارهای مولکولی توانمند جهت مطالعات ژنتیکی می‌باشد. این نشانگر مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده و در سال ۱۹۹۴ جهت مطالعه ارقام زراعی معرفی شد (Zietkiewicz et al.1994). طبیعت تغییرپذیر نواحی ریزماهواره، داشتن حداقل احتیاجات و کاربرد آسان، نشانگر ISSR را به عنوان نشانگری مفید و با صرفه برای بیشتر تحقیقات سیستماتیکی و اکولوژیکی معرفی کرده است (Reddy et al. 2002). تکنیک ISSR اکثر مزایای نشانگرهای AFLP و SSR را با کلیت نشانگر RAPD ترکیب می‌کند و دارای تکرارپذیری بالا، مراحل ساده و کوتاه بوده و از چندشکلی مطلوبی در تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی برخوردار است. در این تکنیک قطعه مابین دو ناحیه تکراری ریزماهواره یکسان که دارای جهت‌گیری مخالف نسبت به هم بر روی ژنوم هستند، بوسیله یک آغازگر ۲۵ – ۱۶ نوکلئوتیدی، که بر اساس نواحی ریزماهواره طراحی شده‌اند تکثیر می‌شود. محصولات تکثیری معمولا دارای طول بین ۲۰۰۰– ۲۰۰ جفت باز هستند (Reddy et al. 2002). نواحی ITS[1] و IGS[2] از توالی‌های ژنومی مناسب به منظور بررسی روابط ژنتیکی می‌باشند. نواحی ITS در منطقه‌ای از DNA ریبوزومی قرار گرفته‌اند که رونویسی می‌شوند. این نواحی شامل دو ناحیه ITS1 (بین ژن rDNA زیرواحد کوچک ریبوزوم و ۵/۸S rDNA) و ITS2 (بین ۵/۸S rDNA و ژن rDNA زیرواحد بزرگ ریبوزوم) هستند و نواحی IGS مناطق بین ژن‌های تکراری rDNA می‌باشند و آنها را از هم جدا می‌نمایند ولی رونویسی نمی‌شوند (شکل۱). این نواحی شامل قسمت‌های محافظت شده و قسمت‌های متغیر هستند. منابع تنوع در این نواحی جانشینی‌های بازی و تغییر در طول می‌تواند باشد. برای آشکارسازی تنوع در این نواحی از آغازگرهای اختصاصی که بر اساس نواحی خیلی محافظت شده rDNA طراحی شده‌اند، استفاده می‌شود. چندشکلی موجود در این نواحی عموما بوسیله توالی‌یابی مشخص می‌شود (Chillali et al.1998; Deng et al.2008). گزارش شده که در سال‌های اخیر بررسی نواحی ITS گیاهان در ۶۶ درصد از مقاله‌های فیلوژنی انجام شده و در ۳۴ درصد مقاله‌های مبتنی بر نواحی ITS، مطالعات به منظور بررسی روابط فیلوژنی انجام گرفته است (Álvarez and Wendel 2003). نواحی ITS برای تفکیک گونه‌های خیلی نزدیک قارچی و نواحی IGS برای مطالعه روابط ژنتیکی بین و درون گونه‌ای مفید هستند (Roose-Amsaleg et

[1] Internal transcribed spacer
[2] Intergenic spacer region

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- نحوه قرارگیری ژن‌های ریبوزومی بر روی ژنوم قارچ خوراکی دکمه‌ای

al. 2002; Zhang et al. 2006). همچنین بررسی توالی ITS نقش مهمی در مطالعات فیلوژنی در سطح جنس و زیرجنس و در تشخیص قارچ‌های ماکروسکوپی بازی کرده است (Zhang et al. 2006).

با توجه به اینکه اجرای برنامه‌های اصلاحی در قارچ دکمه‌ای منوط به شناخت مواد اصلاحی و تشخیص صحیح آنها است، این مطالعه با هدف معرفی روشی ساده و قابل اعتماد برای شناسایی نژادهای قارچ دکمه‌ای به منظور استفاده در برنامه‌های آینده اصلاحی و ثبت نژادی قارچ دکمه‌ای، با تکیه بر توانایی نشانگرهای ISSR و توالی نواحی ITS و IGS ریبوزومی در جداسازی و شناسایی نژادهای مختلف قارچ دکمه‌ای، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از ۲۳ ژنوتیپ قارچ خوراکی دکمه‌ای دریافت شده از آزمایشگاه گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد استفاده شد (جدول۱).

استخراج DNA، از میسلیوم‌های رشد یافته در محیط عصاره کمپوست، بر اساس روش Saghai-Maroof et al. (1984) همراه با تغییراتی انجام شد.

تجزیه داده‌های ISSR

تجزیه نهایی داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی ISSR بکار رفته با استفاده از ۱۳ آغازگر منتخب (جدول ۲) از ۲۰ آغازگر اولیه (هفت آغازگر $(TA)_8C$) ۸۰۵، $(CT)_8RA$) ۸۴۳، $(CT)_8RC$) ۸۴۴، $(CT)_8RG$) ۸۴۵، $(TG)_8RT$) ۸۵۸، $(CT)_8AGA$) P8 و $(CTC)_6$) P38 که باندهای غیر قابل امتیازدهی ایجاد نکردند، حذف شدند.) انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم‌های ۲۰ میکرولیتری شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR (1X) ، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۲ mM)، کلرید منیزیم (۲/۵ mM)، آغازگر (۰/۵ pM) و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز (Genet bio) انجام گرفت. زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف تکثیر به صورت: واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر (دمای اتصال هر آغازگر در جدول ۲ آورده شده است.) به مدت یک دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز TBE با غلظت ۱/۷ درصد انجام شد. ژل‌ها در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد رنگ آمیزی گردید و سپس در دستگاه ترانسلومیناتور vilber lourmat *TCR-20M* عکسبرداری شد. به منظور تعیین فواصل ژنتیکی نژادها الگوی باندی حاصل از ۱۳ آغازگر از نرم افزار TotalLab TL120 به صورت صفر و یک ارزش گذاری شد. سپس ماتریس شباهت ژنتیکی با استفاده از ضریب تعیین فاصله جاکارد محاسبه شد و کلاستربندی با روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYS.2 انجام شد. شاخص PIC[1] برای آغازگرهای ISSR به عنوان یک نشانگر غالب براساس معادله زیر محاسبه شد

$PIC_i = 1-p_i^2-q_i^2$ (Haouari and Ferchichi 2008)

در اینجا p_i فراوانی حضور باند برای هر مکان آغازگر (هر ردیف باند در ژل) و q_i فراوانی عدم حضور باند برای آن مکان آغازگر

[1] Polymorphism information content

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- ژنوتیپ‌های قارچ دکمه‌ای مورد استفاده برای بررسی مولکولی با استفاده از نشانگر ISSR، ITS و IGS

ردیف	نام ژنوتیپ	توصیف	ردیف	نام ژنوتیپ	توصیف
۱	IM002	نژاد دورگ اصلاحی	۱۳	IM00Ca14	تک اسپور گزینش شده از نژاد نامشخص از کانادا
۲	IM003	نژاد دورگ اصلاحی	۱۴	Dezful	نژاد وحشی
۳	IM005	نژاد دورگ اصلاحی	۱۵	737	نژاد تجاری
۴	IM006	نژاد دورگ اصلاحی	۱۶	A15	نژاد تجاری
۵	IM008	نژاد دورگ اصلاحی	۱۷	F60	نژاد تجاری
۶	IM0037	نژاد دورگ اصلاحی	۱۸	2200	نژاد تجاری
۷	IM00H2	تک اسپور گزینش شده از نژاد 737	۱۹	512	نژاد تجاری
۸	IM00H12	تک اسپور گزینش شده از نژاد 737	۲۰	Yousefi	کشت بافت از نژاد نامشخص از دانمارک
۹	IM00H14	تک اسپور گزینش شده از نژاد 737	۲۱	A.wild	*Agaricus* sp.
۱۰	IM00H15	تک اسپور گزینش شده از نژاد 737	۲۲	P1	*Agaricus bitorquis*
۱۱	IM00Ca10	تک اسپور گزینش شده از نژاد نامشخص از کانادا	۲۳	P4	*Agaricus bitorquis*
۱۲	IM00Ca12	تک اسپور گزینش شده از نژاد نامشخص از کانادا			

جدول۲-آغازگرهای ISSR معرفی شده برای تفکیک ژنوتیپ‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال* (°C)
۸۰۷	$(AG)_8T$	۴۶	۸۳۵	$(AG)_8YC$	۵۱
۸۰۸	$(AG)_8C$	۴۹	۸۳۶	$(AG)_8YA$	۴۹
۸۰۹	$(AG)_8G$	۴۹	۸۴۰	$(GA)_8YT$	۴۹
۸۱۰	$(GA)_8T$	۴۷	۸۴۱	$(GA)_8YC$	۵۰
۸۱۱	$(GA)_8C$	۴۸	۸۴۲	$(GA)_8YG$	۵۱
۸۱۲	$(GA)_8A$	۴۷	P39	$(CAAGG)_3$	۴۷
۸۳۴	$(AG)_8YT$	۴۹	Y= C or T, R= A or G		

*دمای اتصال برای هر آغازگر جداگانه بر اساس درجه ذوب ارایه شده توسط شرکت سازنده بهینه سازی شده است.

در جمعیت است و شاخص PIC برای یک آغازگر میانگین PIC_iهای تمام مکان‌های تولید شده توسط آن آغازگر می‌باشد (Kumar et al.2014). بر اساس این معادله مقدار PIC می‌تواند بین صفر و ۰/۵ متغیر باشد.

تجزیه توالی نواحی ITS و IGS

جهت تکثیر کامل ITS از آغازگرهای ITS5: 5′- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG -3′ و ITS4: 5′- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3′ و جهت تکثیر ناحیه IGS1 از آغازگرهای اختصاصی LR12R: 5′- GAACGCCTCTAAGTCAGAATCC -3′ و 5SRNA: 5′- ATCAGACGGGATGCGGT -3′ استفاده شد (White et al.1990; Martin and Rygiewicz 2005). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۶۰ میکرولیتر حاوی ۶۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR (1X)، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۱۶ mM)، کلرید منیزیم (۲/۵ mM)، آغازگر رفت و آغازگر برگشت (۰/۱۶ pM) و یک واحد آنزیم Taq پلیمراز انجام گرفت. زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف تکثیر به صورت واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر شامل واسرشت در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۵ درجه به مدت یک دقیقه، گسترش در ۷۲ درجه به مدت یک دقیقه و تکثیر

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۳- شاخص‌های محاسبه شده برای آغازگرهای ISSR استفاده شده برای بررسی تنوع قارچ خوراکی دکمه‌ای

نام آغازگر	تعداد آلل ایجاد شده	تعداد آلل چندشکل	درصد چندشکلی	تعداد کل باندهای ایجاد شده	شاخص PIC
۸۰۷	۱۹	۱۹	۱۰۰	۱۹۷	۰/۱۶۳
۸۰۸	۱۸	۱۸	۱۰۰	۲۰۶	۰/۲۴۷
۸۰۹	۲۲	۲۱	۹۵/۴	۲۰۲	۰/۱۵۱
۸۱۰	۱۸	۱۸	۱۰۰	۱۰۶	۰/۱۴۶
۸۱۱	۱۹	۱۹	۱۰۰	۱۷۹	۰/۱۷۳
۸۱۲	۹	۹	۱۰۰	۸۶	۰/۱۵۵
۸۳۴	۳۰	۳۰	۱۰۰	۱۹۴	۰/۱۵۱
۸۳۵	۱۵	۱۵	۱۰۰	۱۲۲	۰/۲۱۴
۸۳۶	۱۶	۱۶	۱۰۰	۱۲۴	۰/۱۷۲
۸۴۰	۱۵	۱۵	۱۰۰	۱۴۷	۰/۲۰۵
۸۴۱	۲۷	۲۵	۹۲/۶	۲۳۵	۰/۲۴۶
۸۴۲	۲۳	۲۳	۱۰۰	۱۵۳	۰/۲۲۵
P39	۱۴	۱۴	۱۰۰	۱۳۲	۰/۱۸۵
جمع	۲۴۵	۲۴۲	-	-	-

نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه تنظیم شد. جهت تایید تکثیر این نواحی دو میکرولیتر از محصولات واکنش بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد و الکتروفورز انجام شد. محصولات تکثیری جهت توالی‌یابی به شرکت Bioneer ارسال شد و توالی‌یابی بر اساس هر دو رشته قطعه تکثیری انجام گرفت. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdite (7.3.1.0) مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت.

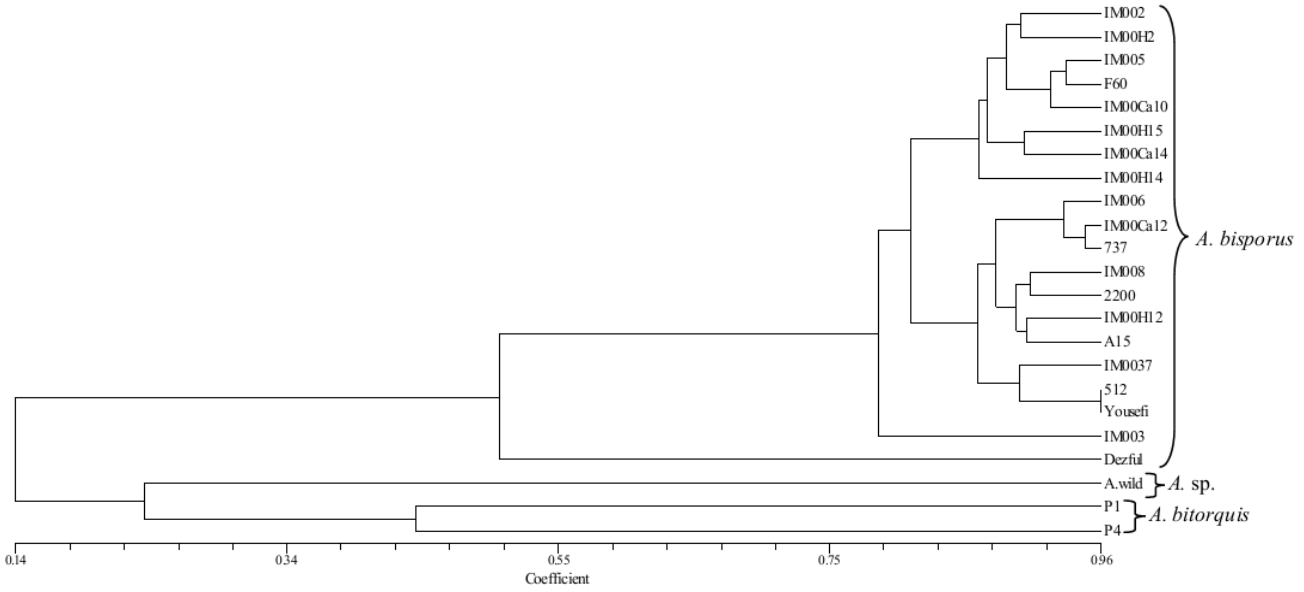
نتایج و بحث

در تجزیه داده‌های ISSR ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۱۳ آغازگر منتخب در مجموع ۲۴۵ باند قابل امتیازدهی ایجاد کردند که ۲۴۲ باند چندشکل تشخیص داده شد. شاخص‌های محاسبه شده برای هر ۱۳ آغازگر در جدول ۳ آمده است. در بین این آغازگرها، آغازگر ۸۴۱ و ۸۰۹ کمترین درصد باندهای چندشکل را بترتیب با ۹۲ و ۹۵ درصد بخود اختصاص دادند و بقیه صد در صد باندهای چندشکل ایجاد کردند.

بر اساس داده‌های ماتریس شباهت، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۱ تا ۰/۹۶۱ متغیر بود. در ماتریس شباهت، نژادهای Yousefi و 512 بیشترین شباهت (۰/۹۶۱) و نژادهای Dezful و P4 کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱) را نشان دادند.

جهت نشان دادن قدرت تفکیک هر آغازگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، نمودار خوشه‌ای بر اساس الگوی باندی هر آغازگر با روش UPGMA رسم شد. بر اساس خوشه‌بندی انجام شده گونه‌های متفاوت قارچ دکمه‌ای در خوشه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند (شکل ۲) و این نشان‌دهنده این است که نشانگر ISSR به طور صحیح گونه‌های مختلف را نیز از هم جدا می‌کند و شباهت ژنتیکی محاسبه شده توسط آنها از صحت بالایی برخوردار است. همچنین در بین ژنوتیپ‌های گونه *A. bisporus* نیز ژنوتیپ‌های اصلاحی کاملا از ژنوتیپ Dezful که یک ژنوتیپ وحشی بومی ایران می‌باشد، جدا شدند و در دسته‌ای جداگانه قرار گرفتند. ژنوتیپ Dezful با همه آغازگرهای منتخب، الگوی باندی متفاوتی از خود نشان داده بود. کلیه نژادهای اصلاحی در سطح ۷۵ درصد شباهت ژنتیکی در یک خوشه قرار گرفتند (شکل۲) و با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های خواهری نیز در داخل این خوشه پراکنده بودند نشان می‌دهد که تمام ژنوتیپ‌های اصلاحی قرابت نزدیکی با هم دارند و به احتمال زیاد از اجداد یکسانی برخوردار هستند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲- دندروگرام حاصل از بررسی فواصل ژنتیکی ۲۳ نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR براساس روش UPGMA

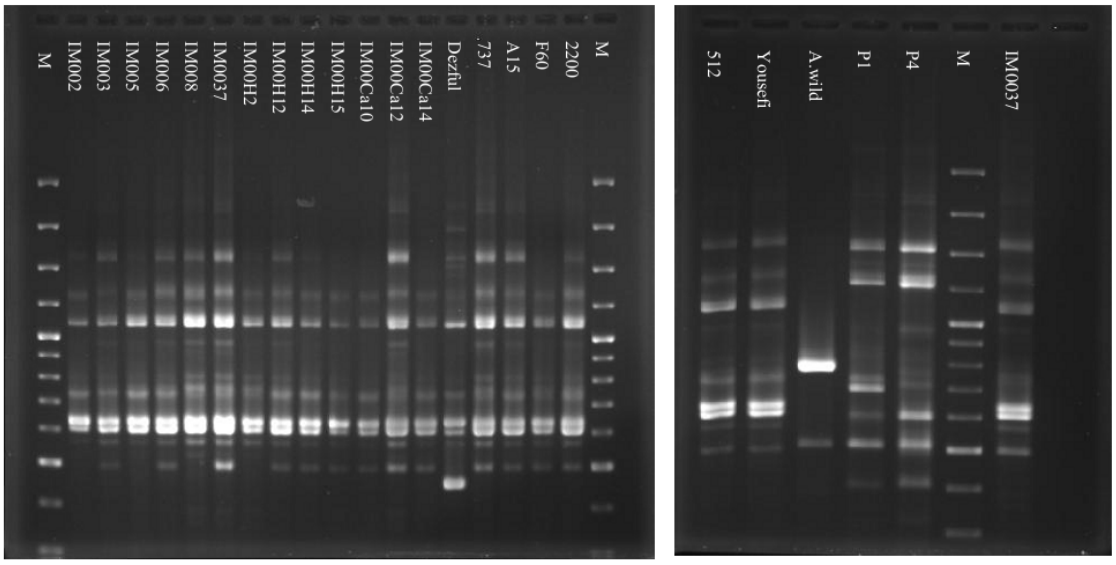
همچنین بر اساس ضریب شباهت و خوشه‌بندی رسم شده به نظر می‌رسد والد نژادهای اسپوری IM00Ca10، IM00Ca12 و IM00Ca14 که نامشخص می‌باشد نیز نژاد 737 باشد. همچنین از بین ۱۳ آغازگر منتخب، ۴ آغازگر ۸۰۸، ۸۰۹، ۸۴۱ و ۸۴۲ توانستند تمامی‌نژادهای مورد آزمایش را از هم مجزا و تفکیک نمایند.

بر اساس نتایج می‌توان استنباط کرد که آغازگرهای ISSR دارای توالی $(AG)_n$ یا $(GA)_n$ قدرت تفکیک مناسبی را برای جداسازی نژادهای قارچ خوراکی دکمه‌ای دارند و این می‌تواند نشان دهنده این باشد که اولا این توالی‌ها دارای پراکندگی خوبی در ژنوم این قارچ هستند و ثانیا تنوع این توالی‌ها در قارچ دکمه‌ای بالا است؛ این نتایج با یافته‌های قبلی بر روی نژادهای تجاری چین مطابقت دارد (Guan et al. 2008). محققان نژادهای موجود در چین را تنها با دو آغازگر ۸۱۰ و ۸۴۲ کاملا از هم تفکیک کردند و عنوان کردند که این دو کارآمدترین آغازگرهای آنها برای تفکیک تمامی نژادهای مورد مطالعه آنها بود (Guan et al. 2008).

درحالی‌که نتایج ما نشان داد که آغازگر ۸۱۰ کارایی چندانی ندارد و در عوض آغازگر ۸۰۸ آغازگر مناسب‌تری جهت تفکیک نژادهای موجود در ایران می‌باشد (شکل۳). به علاوه در این مطالعه چهار آغازگر برای تفکیک نژادها از یکدیگر نیاز بود. دلیل آن را می توان به این صورت توضیح داد که نژادهای اصلاح شده در ایران منشا خیلی نزدیکی داشته و حتی تعدادی از آنها خواهر و برادر هستند و بنابراین تنوع ژنتیکی و تنوع نشانگری کمتری نشان می‌دهند.

شاخص PIC که در واقع بیانگر ارزش یک نشانگر برای تشخیص چندشکلی در یک جمعیت می‌باشد، بر اساس تعداد آلل‌های شناسایی شده و نحوه پراکنش آنها در جمعیت محاسبه می‌شود و در حال حاضر به عنوان پرکاربردترین آماره ارزشیابی نشانگرها شناخته می‌شود (Nagy et al. 2012). میانگین PIC آغازگرهای مورد آزمون در این پژوهش ۰/۱۸۷ بود که با توجه به اینکه حداکثر PIC در نشانگرهای غالب ۰/۵ است (Nagy et al. 2012) نشان‌دهنده این است که اکثر ژنوتیپ‌های تجاری قارچ خوراکی ایران دارای روابط خویشاوندی نزدیکی هستند (جدول ۳). همانطورکه نتایج نشان می‌دهد در بین آغازگرها، آغازگرهای ۸۰۸ و ۸۴۱ که PIC حدود ۰/۲۵ دارند می‌توانند یکی از کارآترین آغازگرها در بررسی ژنوتیپ‌های با زمینه ژنتیکی نزدیک قارچ خوراکی دکمه‌ای همچون ژنوتیپ‌های موجود در ایران باشند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- نیمرخ ژل الکتروفورز محصولات تکثیری آغازگر M ،۸۰۸ سایز مارکر 100 plus – نمونه شماره IM0037 جهت تطابق باندها در هردو ژل تکرار شده است.

نتایج ما نشان داد که نشانگر ISSR توانایی بالایی در تفکیک نژادهای قارچ خوراکی دکمه‌ای که خویشاوندی نزدیکی با یکدیگر دارند، را دارا می‌باشد. نتایج بدست آمده در این آزمایش همانند سایر یافته‌ها در تجزیه جمعیت‌هایی با قرابت ژنتیکی زیاد که بر روی جمعیت‌ها و شجره‌هایی از انگور، کاهو، گوجه، کاج، ماهی‌قزل‌آلا، ماکیان، گاو هلشتاین و انسان، استفاده شده‌اند مطابقت دارد و قابلیت نشانگر ISSR را در شناسایی و تفکیک افراد خویشاوند مورد تایید قرار می‌دهد (Gupta et al.1994).

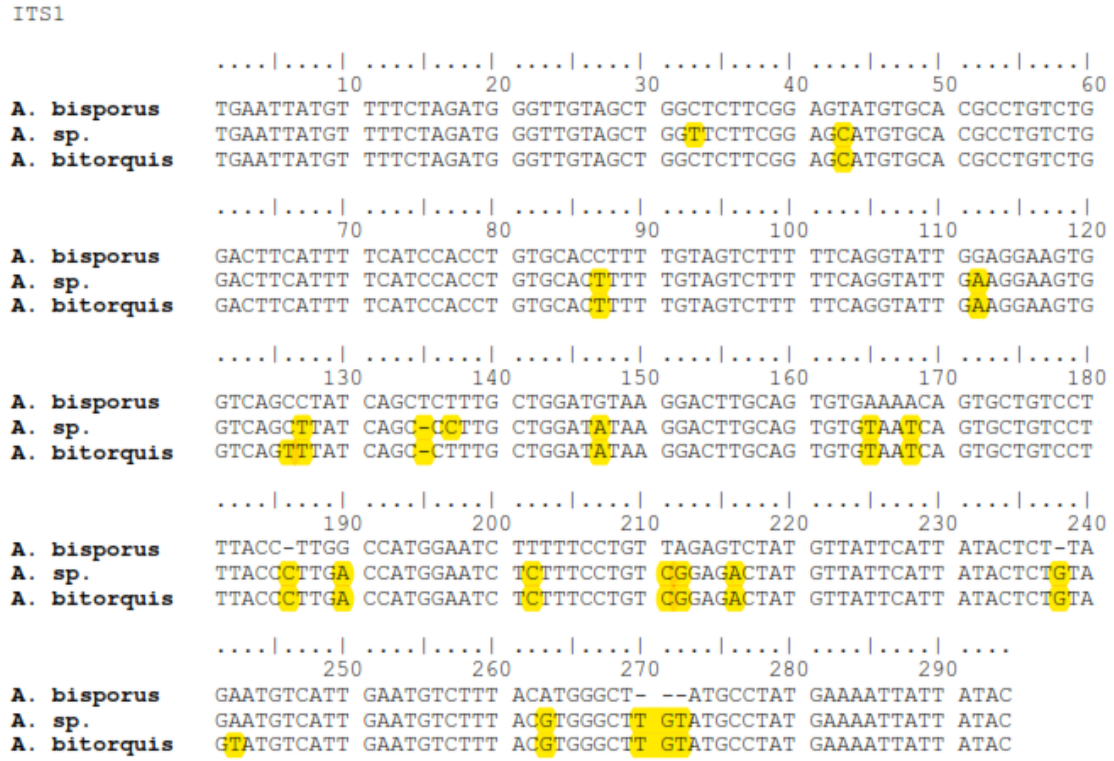
تجزیه توالی نواحی ITS نشان داد که در هر دو منطقه ITS1 و ITS2 هیچگونه تفاوت بازی بین نژادهای درون یک گونه وجود ندارد و بازهای نوکلئوتیدی این نواحی صد در صد یکسان است اما بین گونه‌های مختلف این تفاوت کاملا آشکار بود به‌طوری‌که هم تفاوت بازی وجود دارد و هم طول این نواحی متفاوت است. طول ناحیه ITS1 در *A. bisporus*، ۲۸۹ جفت باز و در گونه‌های *A. bitorquis* و *A. sp.*، ۲۹۳ جفت باز می‌باشد (شکل ۴). شباهت بین ناحیه ITS1 بین گونه‌های *A. bisporus* و *A. bitorquis*، ۰/۹۲۹، بین گونه‌های *A. bitorquis* و *A. sp.*، ۰/۹۸۶ و بین *A. bisporus* و *A. sp.*، ۰/۹۲۹ می‌باشد.

طول ناحیه ITS2 در *A. bisporus*، ۲۰۸ جفت باز و در گونه‌های *A. bitorquis* و *A. sp.*، ۲۱۰ جفت باز می‌باشد (شکل ۵). شباهت بین ناحیه ITS2 بین گونه‌های *A. bisporus* و *A. bitorquis*، ۰/۹۳۳، بین گونه‌های *A. bitorquis* و *A. sp.*، ۰/۹۹۱ و بین *A. bisporus* و *A. sp.*، ۰/۹۳۳ می‌باشد.

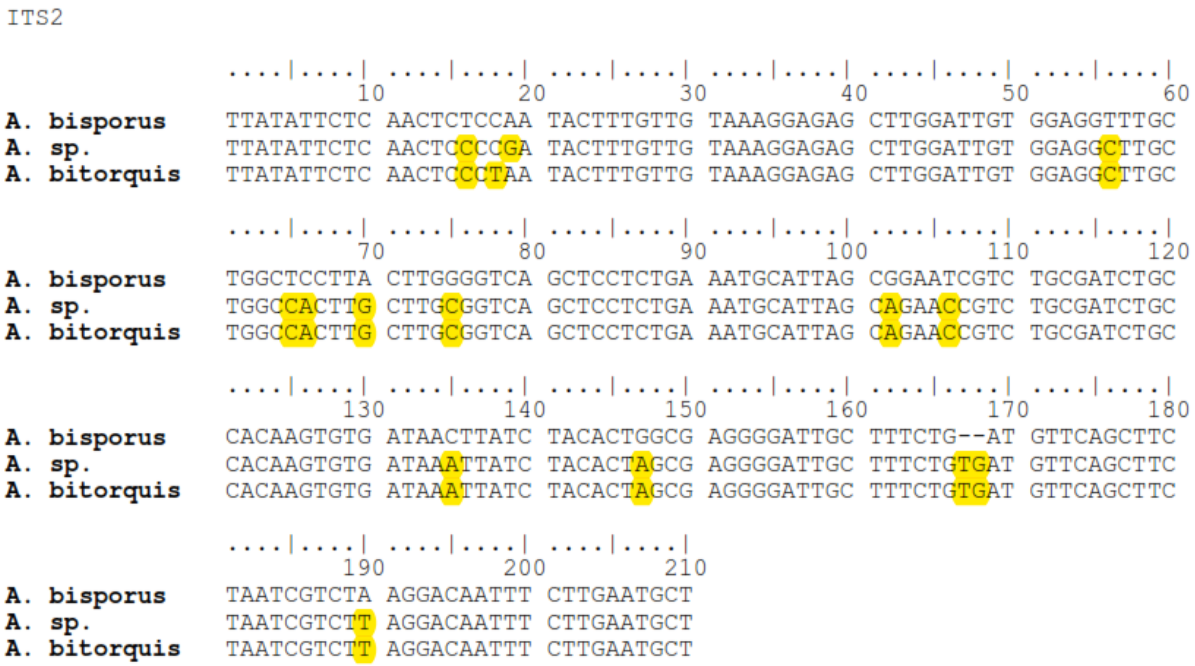
نتایج توالی‌یابی نواحی ITS ژنوتیپ‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای نشان داد که تفاوتی در نوکلئوتیدهای این نواحی در درون گونه وجود ندارد و تنها تفاوت بین گونه‌ها مشاهده می‌شود، در صورتی‌که عنوان شده که این نواحی دارای ثبات پایینی می‌باشند و جهت تعیین تفاوت‌های بین و درون گونه‌ای در قارچ‌ها بهتر از نواحی rDNA می‌باشند (Deng et al. 2008). همچنین نتایج ما با اظهارات Geml et al. (2004) که نواحی ITS گونه‌ها و نژادهای قارچ‌های جنس *Agaricus* را مورد بررسی قرار داده و تفاوت و تمایز در سطح درون گونه‌ای را گزارش کرده بودند، مغایرت دارد.

توالی‌یابی ناحیه IGS1 به طول تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز برای تمام نژادهای *A.bisporus* و نژاد P1 ازگونه *A .bitorquis* با موفقیت به صورت رفت و برگشت انجام شد. در بین نژادهای *A. bisporus* تنها یک تفاوت نوکلئوتیدی در این ناحیه مشاهده شد که مربوط به نژاد وحشی Dezful بود. در این جایگاه باز سیتوزین جایگزین گوانین شده است. تفاوت در این ناحیه بین دو گونه *A. bitorquis* و *A. bisporus* از لحاظ طول توالی و ترتیب بازها

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴- همردیف‌سازی (alignment) توالی‌های ITS1، نواحی رنگی نشان دهنده تفاوت بازی بین گونه‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد.



شکل ۵- همردیف سازی (alignment) توالی‌های ITS2، نواحی رنگی نشان دهنده تفاوت بازی بین گونه‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد.

www.SID.ir

دارای تفاوت‌های آشکاری بود به‌طوریکه طول این ناحیه در *A. bisporus*، ۱۱۷۶ جفت باز و در *A. bitorquis*، ۱۲۰۱ جفت باز بود. شباهت بین ناحیه IGS1 بین گونه‌های *A. bisporus* و *A. bitorquis*، ۰/۸۱۲ می‌باشد.

با وجود اینکه گزارشات قبلی (Chillali et al.1998; Martin and Rygiewicz 2005) حاکی از این بود که نواحی IGS دارای تنوع مناسبی برای تشخیص درون گونه‌ای هستند اما توالی‌یابی ناحیه IGS1 قارچ دکمه‌ای نیز نتایج مشابهی همانند نواحی ITS را ارایه داد و تنها تفاوت‌ها در سطح بین گونه‌ای مشاهده شد.

نتایج بدست آمده می‌تواند نشانگر این واقعیت باشد که نواحی ITS و IGS در قارچ دکمه‌ای در درون گونه‌ها حفاظت‌شده بوده و ابزاری مناسب جهت تفکیک نژادها در این قارچ نمی‌باشد. اما از لحاظ تاکسونومیکی برای تعیین گونه در جنس *Agaricus* مناسب می‌باشد که این موضوع می‌تواند کمک شایانی به پروژه‌های جمع‌آوری قارچ‌های دکمه‌ای وحشی برای طبقه بندی و شناسایی آنها باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج بدست آمده از سه روش مورد ارزیابی می‌توان به این نتیجه رسید که استفاده از نشانگر ISSR در قارچ خوراکی دکمه‌ای به دلیل اینکه قابلیت جداسازی و تفکیک ژنوتیپ‌های متفاوت نتاج منشا گرفته از یک والد را دارد، می‌تواند ابزاری مفید جهت تفکیک نژادی و حتی ثبت نژادها باشد. نواحی ITS و IGS نیز که در درون یک گونه ثبات داشتند و بین گونه‌ها متفاوت بودند نیز می‌توانند به عنوان ابزاری در تعیین گونه‌های جنس *Agaricus* معرفی شوند.

منابع

Al-Momany AM, Saleh G (2009) A comprehensive study on *Agaricus* species of North Cyprus. World Journal of Agricultural Sciences 5: 195-200.

Álvarez FI, Wendel JF (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution 29: 417-434.

Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1987) Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. Applied and Environmental Microbiology 53:816-822.

Chillali M, Idder Ighili H, Guillaumin JJ, Mohammed C, Long Escarmant B, Botton B (1998) Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. Mycological Research 102: 533-540.

Deng W, Xi D, Mao H, Wanapat M (2008) The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. Molecular Biology Reports 35: 265-274.

Geml J, Geiser DM, Rose DJ (2004) Molecular evolution of *Agaricus* species based on ITS and LSU rDNA sequences. Mycological Progress 3: 157-176.

Ghorbani Faal P, Farsi M, Pourianfar H, mahmoudnia Meimand M, Zolala J (2009) Preparation of AFLP Mediated-Molecular Certificate for 12 Bred Strains of the Button Mushroom, Agaricus bisporus. Journal of plant protection 23: 58-67 (In Farsi).

Guan XJ, Xu L, Shao YC, Wang ZR, Chen FS, Luo XC (2008) Differentiation of commercial strains of Agaricus species in China with inter-simple sequence repeat marker. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:1617-1622.

Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994) Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 89: 998-1006.

Haouari M, Ferchichi A (2008) Study of genetic polymorphism of Artemisia herba-alba from Tunisia using ISSR markers. African Journal of Biotechnology 7: 44-50.

Kumar A, Mishra P, Singh SC, Sundaresan V (2014) Efficiency of ISSR and RAPD markers in genetic divergence analysis and conservation management of *Justicia adhatoda* L.,a medicinal plant. Plant Systematics and Evolution, online: DOI 10.1007/s00606-013-0970-z

Ma FY, Luo XC (2002) PCR-based restriction analysis of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in the genus *Pleurotus*. Mycosystema 21:356-362.

Martin KJ, Rygiewicz PT (2005) Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. BMC Microbiology 5:28 Available at: http:// www.biomedcentral.com/ 1471-2180/5/28

Moore AJ, Challen MP, Warner PJ, Elliott TJ (2001) RAPD discrimination of *Agaricus bisporus* mushroom cultivars. Applied Microbiology and Biotechnology 55: 742-749.

Nagy S, Poczai P, Cernak I, Mousapour Gorji A, Hegedus G, Taller J (2012) PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. Biochemical Genetics 50:670-672.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euyphytica 128: 9-17.

Archive of SID
www.SID.ir

Roose-Amsaleg C, Vallavieille-Pope C, Brygoo Y, Levis C (2002) Characterisation of a length polymorphism in the two intergenic spacers of ribosomal RNA in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat yellow rust. Mycological Research 106: 918-924.

Royse DJ, May B (1982) Use of isozyme variation to identify classes of *Agaricus brunnescens*. Mycologia 74:93-102.

Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allad RW (1984) DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, Chromosomal location and Population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 8014-8018.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press Inc., New York 315-322.

Zhang JX, Huang CY, Bun Ng T, Wang H (2006) Genetic polymorphism of ferula mushroom growing on Ferula sinkiangensis. Applied Microbiology and Biotechnology 71: 304-309.

Zhang R, Huang C, Zheng S, Zhang J, Bun Ng T, Jiang R, Zuo X, Wang H (2007) Strain-typing of *Lentinula edodes* in China with inter simple sequence repeat markers. Applied Microbiology and Biotechnology 74: 140-145.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)–anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Archive of SID

www.SID.ir