مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

شناسایی جدایه‌های تک اسپور هموکاریون و ارزیابی فاصله ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نشانگر SSR در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)

مکیه بیراتی[۱]، سعید ملک‌زاده شفارودی[۲]، خلیل ملک‌زاده*[۳]، امین میرشمسی کاخکی[٤]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی ،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی ،دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] مربی پژوهش، گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاددانشگاهی واحد مشهد

[٤] استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰٤/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۲/۲۰

چکیده

تلاقی درون گونه‌ای مهمترین روش اصلاحی در قارچ دکمه‌ای سفید برای بهبود نژادهای تجاری آن می‌باشد و این مستلزم در اختیار داشتن جدایه‌های هموکاریون برای تلاقی است. چرخه زندگی خاص این قارچ – هموتالیسم ثانویه – سبب شده تنها درصد کمی از بازیدیوسپورها به صورت هموکاریون باشند. تشخیص و شناسایی جدایه‌های هموکاریون‌ها از جدایه‌های هتروکاریون بزرگترین مشکل پیش روی اصلاح‌گران بوده است. تاکنون روش مطمئنی برای تشخیص این جدایه‌ها گزارش نشده است. در این مطالعه از ۱۰ نشانگر ریزماهواره (SSR) که ۹ عدد از آن ها هر کدام نماینده یک گروه لینکاژی از نقشه ژنتیکی این قارچ بودند؛ همراه با آزمون میوه‌دهی برای تشخیص هموکاریون‌ها استفاده شد. از ۷۱ جدایه‌ی مورد آزمون برخی همانند والد مادری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شد دارای دو باند و برخی دیگر تنها حضور یکی از باندهای والدی را نشان دادند. بر اساس نوع ترکیب آللی، جدایه‌ها در دو گروه کلی هتروآللیک و هموآللیک قرار گرفتند. از گروه هموآللیک، ۲۳ جدایه که در تمامی جایگاه‌های بررسی شده الگوی تک آللی را نشان دادند به عنوان جدایه هموکاریون در نظر گرفته شدند. مقایسه نتایج حاصل از نشانگرهای SSR و آزمون میوه‌دهی بر روی جدایه‌ها نشان داد نتایج حاصل از آزمون میوه‌دهی در مقایسه با نتایج نشانگرهای SSR از اطمینان کمتری برخوردارند زیرا عدم میوه‌دهی در جدایه‌هایی که هتروکاریون بودن آن‌ها توسط نشانگر SSR مشخص شد، مشاهده گردید. تشابه ژنتیکی محاسبه شده بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی بین۲۳ جدایه هموکاریون بین ۰/۳ تا ۱ متغیر بود و این جدایه‌ها در دندروگرام ترسیم شده به دو گروه کلی تقسیم شدند. نتایج نشان دادند می‌توان با احتمالی بیش از ۹۹/۸ درصد نسبت به قطعیت هموکاریون بودن جدایه‌ها پس از اجرای آزمایش با ۱۰ آغازگر SSR استفاده شده، اظهار نظر کرد.

واژه‌های کلیدی: *قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید، نشانگر ریزماهواره، هموکاریون، هتروکاریون، هیبرید.*

* نویسنده مسئول: خلیل ملک‌زاده تلفن: ۰۹۱۷۱۲۷۹۳۸۷ Email: khalil.malekzadeh@gmail.com

مقدمه

قارچ دکمه‌ای سفید یکی از مهمترین گونه‌های قارچ خوراکی در جهان محسوب می‌شود و بیشترین تولید و سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (Singer & Harris, 1987). با در نظر گرفتن ارزش تغذیه‌ای و اقتصادی بالای این قارچ، در مقایسه با گیاهان زراعی با ارزش، تلاش کمی برای بهبود ژنتیکی نژادهای آن صورت گرفته است (Horgen & Anderson, 1992). یکی از دلایل اصلی کندی و عدم پیشرفت در برنامه‌های اصلاحی، چرخه زندگی هموتالیسم ثانویه در این قارچ است (Kerrigan & Spear, 1997; Castle *et al*., 1988).

در اکثر گونه‌های بازیدیومایست در سطح هر بازیدیوم چهار بازیدیا وجود دارد که هر یک دارای یک اسپور می‌باشند (Kerrigan & Spear, 1997; Castle *et al*., 1988). ولی در *Agaricus bisporus* به دلیل چرخه زندگی هموتالیسم ثانویه بیش از ۹۰ درصد بازیدیاها دارای دو اسپور هستند، که هر اسپور دو هسته بعد از میوزی با تیپ آمیزشی متفاوت را دریافت می‌کند. بنابراین اکثر اسپورها هتروکاریون و خود بارور می‌باشند و بنابراین فراوانی اسپورهایی با یک هسته میوزی (هموکاریون) بسیار پایین است (Kerrigan and Spear, 1997; Castle *et al*., 1988; Callac *et al*., 1988; Foulongne-Oriol *et al*. 2010).

روش‌های متعدد اصلاحی بکار رفته در این قارچ به دو دسته کلی اصلاح درون نژادی و اصلاح برون‌نژادی تقسیم می‌شود. در اصلاح درون نژادی از روش‌های اصلاحی چون کشت بافت (Mehta & Bhandal, 1994)، کشت‌های تک‌اسپوری و چنداسپوری (Mehta & Bhandal, 1994; Fritsche & Sonnenberg, 1988) استفاده می‌گردد و روش‌هایی چون مخلوط کردن نژادهای تجاری موجود برای تشکیل کشت‌های هیبرید (Mehta & Bhandal, 1994) و تلاقی بین هموکاریون‌ها و گزینش از میان نتایج تلاقی از جمله روش‌های اصلاح برون‌نژادی می‌باشند. کارآمدترین روش به‌نژادی به منظور تجمع صفات مطلوب از نژادهای مختلف و تولید یک ژرم‌پلاسم جدید با خصوصیات کمی و کیفی مطلوب‌تر از نژاد اولیه، تلاقی بین هموکاریون‌ها و گزینش از میان نتاج تلاقی است (Kerrigan *et al*., 1992; Kerrigan and Spear, 1997; Foulongne-Oriol *et al*. 2010; Nazrul & Yin-Bing, 2010).

اولین هیبریدهای تجاری برطبق این روش، طی سال‌های ۱۹۷۰-۱۹۸۰ توسط دکتر فریتش حاصل شد. وی توانست پس از گزینش جدایه‌های تک‌اسپور کندرشد از دو هتروکاریون تجاری با صفات زراعی متقابل، و انجام تلاقی بین آن‌ها، نژادهای U1 وU3 را به بازار جهانی عرضه کند، آزادسازی این دو نژاد نقطه عطفی در تاریخ اصلاح *A. bisporus* بود (Fritsche & Sonnenberg, 1988). برای انجام یک برنامه به‌نژادی مبتنی بر این روش دورگ‌گیری ابتدا بایستی جدایه‌های هموکاریون را بدست آورد. در نژادهای تجاری *A. bisporus* فراوانی بازیدیوسپورهای هموکاریون بسیار پایین است

Miller & Kananen, 1972; Miller, 1971;) Kerrigan *et al*., 1993; Khush *et al*., 1995; Callac *et al*., 1996:) و نشانگر مورفولوژیکی مطمئنی برای تشخیص جدایه‌های هموکاریون از هتروکاریون شناسایی نشده است، لذا اکثر تلاش‌های به‌نژادگران معطوف بر جداسازی و تشخیص جدایه‌های هموکاریون بوده است Kerrigan *et al*., 1992; Kerrigan & Spear,) 1997) در روش آزمون میوه‌دهی که یک روش مرسوم برای تشخیص هموکاریون‌ها محسوب می‌گردد، فرض بر این است که میسلیوم ناشی از اسپورهای با یک هسته میوزی، قدرت تولید اندام باردهی ندارد، لذا برخلاف جدایه‌های هتروکاریون، در آزمون میوه‌دهی، میوه‌ای حاصل نمی‌کنند (Royse & May 1982; Callac *et al*., ; Horgen & Anderson, 1992; Kerrigan 1988; *et al*., 1992). در هتروکاریون‌ها نیز گاهی عواملی بجز سطح پلوئیدی و سازگاری آمیزشی می‌تواند بر میوه‌دهی اثر بگذارد و برعکس گاهی اوقات میوه‌دهی محدودی در برخی هموکاریون‌ها دیده می‌شود (May & Royse, 1982; Dickhardt,1985; Callac *et al*., 1988; Kerrigan *et al*., 1992). به طور کلی این روش بسیار وقت‌گیر، پرهزینه و غیر قابل اطمینان است Horgen & Anderson, 1992; Khush *et al*.,) 1995).

ابزارهای جدیدی چون استفاده از نشانگرهای آیزوزایمی برای جداسازی هموکاریون‌ها مرسوم گردیده است اما از آنجایی‌که بررسی آیزوزایم‌ها در *A. bisporus* تنها به ده لوکوس محدود می‌گردید و با معرفی نشانگرهای DNA، استفاده از آن‌ها چندان متداول نشد (Castle *et al*., 1987; Khush *et al*., 1995; Kerrigan, & Spear, 1997). نشانگرهای RFLP اولین نشانگرهایی بودند که در این قارچ مورد استفاده قرار گرفتند (Summerbell*et al*., 1989). پس از آن نشانگرهایی چون RAPD و ISSR هرکدام برای تشخیص هموکاریون‌ها به کار رفتند ولی هریک به ترتیب دارای محدودیت‌هایی چون پرزحمت و وقت‌گیر، تکرارپذیری پایین و غالبیت بودند. Taylor *et al*., 1999; Ramirez *et al*., 2001;) Dutech *et al*., 2007; Foulongne-Oriol *et al*., 2009; Nazrul & Yin-Bing, 2010).

ریزماهواره‌ها (توالی‌های تکراری ساده) شامل تکرارهای پشت سرهم و کوتاه ٦-١ نوکلئوتیدی از DNA می‌باشند که از نظر طولی با هم متفاوتند و به طور گسترده در ژنوم اکثر یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها پراکنده می‌باشند Zane *et al*., 2002; Varshney *et al*., 2005;) Benbouza *et al*., 2006; Foulongne-Oriol *et al*., 2009; Zhang *et al*., 2010). استفاده از ریزماهواره‌ها در قارچ‌ها از دهه ۱۹۹۰ شروع شد و کاربرد این نشانگر در *A. bisporus* در سال ۲۰۰۰ توسط Barroso و همکاران (2000) گزارش شد. این محققین نواحی با توالی تکراری چهارنوکلئوتیدی $(TATG)_4$ را در ژنوم *A. bisporus* شناسایی و جداسازی نمودند و نشان دادند که این توالی در ۵ نژاد *A. bisporus* و ۳ نژاد *Pleurotus* وجود دارد. تنوع ژنتیکی مشاهده شده در توالی‌های ریزماهواره، نشان از کارایی

مناسب این نشانگر در انگشت‌نگاری و مطالعات تنوع ژنتیکی در قارچ‌های تجاری و وحشی دارد (Barroso *et al*., 2000). Foulongne و همکاران (2009) با بررسی ۷۳۲ توالی خاص از DNA قارچ *A. bisporus* توانستند ۳۳ توالی ریزماهواره را شناسایی و آغازگرهایی برای تکثیر آن‌ها طراحی کنند.

هدف این مطالعه استفاده از نشانگر هم‌بارز و چندشکل SSR برای گزینش جدایه‌های هموکاریون در مدت زمان کوتاه‌تر و با فراوانی بالاتر بود. در نتیجه تعداد بیشتری هموکاریون با تنوع ژنتیکی مشخص جداسازی خواهد شد و تلاقی‌های موفق‌تری در بازه زمانی کوتاه‌تری انجام خواهد پذیرفت. بنابراین فرایند اصلاح در قارچ خوراکی دکمه‌ای آسان‌تر شده و نژادهای متنوع‌تری تولید خواهند شد.

مواد و روش‌ها

سه نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید IM008، Holand-737 و Canada-10 از گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد دریافت شد و برای تهیه نقش اسپور استفاده گردید. پس از تهیه نقش اسپور از هر یک از نژادها، مایع تعلیقی از اسپورها با غلظت حدود 10^5 اسپور بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس در هر پتری‌دیش حاوی محیط کشت PDA حدود ۱۵ تا ۲۰ هزار اسپور از این مایع تعلیقی کشت داده شد. پری‌دیش‌های کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت دو الی سه روز از زمان کشت اسپورها، بصورت روزانه وضعیت رشد اسپورها بوسیله میکروسکوپ و یا چشم بررسی شد، تک‌اسپورهایی که رشد سریعی داشتند حذف شدند و تک‌اسپورهای کند رشدتر به پتری‌دیش‌های جدید حاوی محیط کشت عصاره کمپوست منتقل شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند.

برای آزمون میوه‌دهی، ابتدا از همه جدایه‌ها اسپاون تهیه گردید. سپس ۱۰ گرم از اسپاون هر جدایه در کیسه‌های به وزن ۹۰۰ گرم کمپوست و در سه تکرار مایه‌زنی انجام شد. شرایط رشدی به صورت استاندارد اعمال شد.

استخراج DNA از میسلیوم‌های ۳۰- ۲۰ روزه رشدیافته در محیط مایع عصاره کمپوست به روش CTAB همراه با تغییرات اندکی انجام شد (Soltis, 2002).

واکنش‌های PCR-SSR با استفاده از ۱۰ آغازگر ذکر شده در جدول ۱ (Foulongne-Oriol *et al*., 2009) و در حجم ۲۰ میکرولیتر برای تک‌اسپور جداسازی شده و نمونه‌های مادری به عنوان شاهد هتروزیگوس انجام شد. چرخه‌های تکثیر به صورت: مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل که شامل ٤٥ ثانیه با دمای ۹٤ و پس از آن مرحله اتصال بر اساس دمای اتصال هر آغازگر (جدول ۱) ٤٥ ثانیه و مرحله تکثیر به مدت ۳۰ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. فراورده‌های

PCR-SSR درون چاهک‌های ژل آکریل‌آمید ۸ درصد ریزش شدند.

امتیازدهی باندها و تجزیه تحلیل اطلاعات DNA براساس مکان‌های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر، وجود باند با "۱" و فقدان آن با "۰" امتیازدهی شد. داده‌ها پس از ورود به محیط Excel برای تجزیه و تحلیل به نرم‌افزار NTSYSpc (2.02e) منتقل شدند.

جدول۱- لیست آغازگرهای SSR مورد استفاده.

Table 1– Used SRR primers list.

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Linkage group
AbSSR 04	*F:ACAACAACCGCCACCACCAT *R:CAGGCGTATATCGCTGTTGCTG	58	IX
AbSSR 06	F:ACCACATTCTGGAAAACGAA R:TTAATGCTCTTGGCTTCGA	58	IV
AbSSR 09	F:ACAAGAAGGGGAGGATTGAG R:ATAGTCGCGTAACCCCTCTT	55	IIX
AbSSR 23	F:TTTGGGATGTGACCAGACTT R:AACGTTGGGTTCAATGAAAA	55	I
AbSSR 36	F:CGTTGATGGAGTTGACTGAG R:ACAACAAAATCGTCGTGAGG	58	IIIV
AbSSR 45	F:CACCTTACACGGCCATTGAT R:AAAACTTCGGGCATTTCCTT	55	VII
AbSSR 54	F:TGACCAAAGCTCAAACAGCA R:GTCACGGATCATCGGTTTCT	55	IX
AbSSR 58	F:ATGTCGAGGAGGAGGAGGAT R:AGGGAGAGGGAGAGGGATTT	55	II
AbSSR 62	F:GTTGGTCACGAACTCATGCT R:CCCAATCACCTCCTTGTGT	55	III
AbSSR 65	F:ACCTCAACGATTCCAACGAC R:TCCATAAACACCCCTTCTCG	55	II

***F= Forward primer, R= Reverse primer**

نتایج

از ۳ نژاد مورد بررسی IM008، Holand-737 و Canada-10، هر کدام به ترتیب ۱۸، ۲٦ و ۲۷ عدد تک‌اسپور کند رشد جداسازی و انتخاب گردید. نتایج آزمون میوه‌دهی در جدول ۲ ارائه شده است. میسلیوم برخی نمونه‌ها از IM008

(۹)، Holand-737 (۱۳، ۱۷، ۱۸) و Canada-10 (۱٤، ۲۰، ۲۵، ۲٦) بر روی ماده زمینه‌ای در هیچ یک از تکرارها رشد نکردند و در نتیجه اسپاونی از آن ها به دست نیامد، به همین دلیل در آزمون میوه‌دهی شرکت داده نشدند. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، از ۷۱ جدایه تک‌اسپور کندرشد مورد بررسی، ۳۲ جدایه در حداقل دو تکرار اندام باردهی تولید کردند و در ۲۱ جدایه میوه‌دهی کامل مشاهده نشد که در این میان برخی جدایه‌ها تنها در یک تکرار اندام میوه‌دهی بالغ تولید کردند و برخی دیگر در یک یا دو تکرارچند اندام میوه‌دهی اولیه (پریمودریا) تولید کردند که به میوه بالغ تبدیل نشدند و در برخی دیگر علی‌رغم اینکه میسلیوم رویشی سطح خاک پوششی را سفید کرد ولی پس از شوک سرمایی میوه‌ای حاصل نشد (شکل ۱).

الگوهای باندی نشانگر ریزماهواره

هر یک از آغازگرهای استفاده شده در هر سه والد هتروکاریون که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند، دو باند قابل امتیازدهی ایجاد کردند، برخی نمونه‌ها الگوی باندی شبیه والد هتروکاریون – حضور دو باند– و برخی دیگر تنها یکی از دو باند والدی را دارا بودند. ۱۰ آغازگر استفاده شده بطور کلی ۲۰ باند واضح (با پلی‌مورفیسم ۱۰۰٪) حاصل کردند که باندهایی با اندازه بین ۲۲۰–۱٤۷ ایجاد نمودند (شکل ۲).

از ۷۱ جدایه بدست آمده، ٤۸ جدایه که دارای حداقل ۱ جایگاه هتروزیگوس بودند– داشتن هر دو باند مشاهده شده در والد مادری– به عنوان جدایه‌های هتروآللیک و ۲۳ جدایه که در تمامی مکان‌های ژنی بررسی شده کاملاً هموزیگوس بودند – دارای تنها یکی از باندهای مشاهده شده در والد مادری– به عنوان جدایه‌های هموآللیک دسته بندی شدند (جدول ۲).

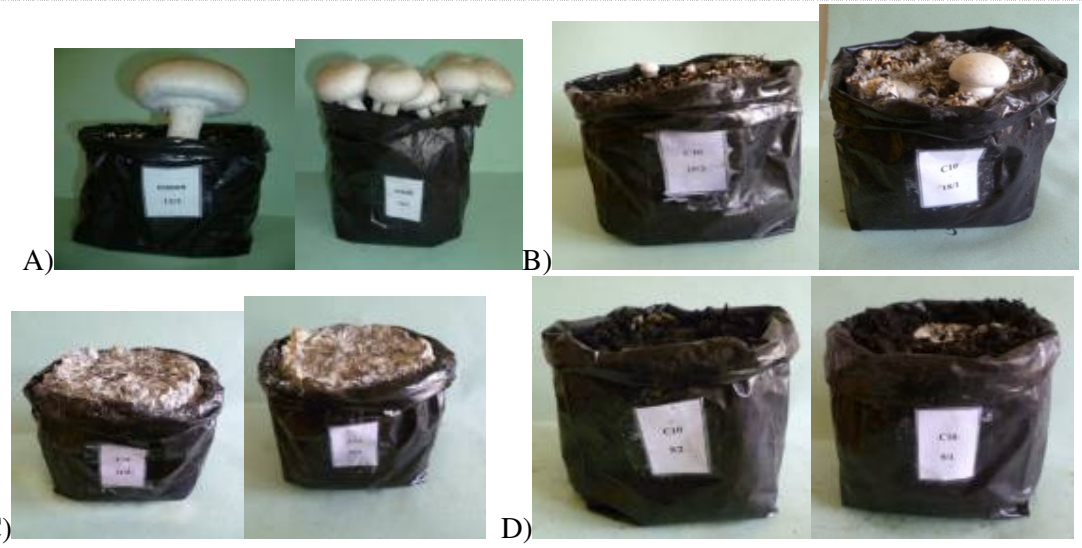
گروه‌بندی جدایه‌های هموکاریون بر اساس فاصله ژنتیکی

از هر یک از نژادهای تجاری IM008، Holand-737 و Canada-10، به ترتیب ۸، ۸ و ۷ هموکاریون به دست آمد. به منظور محاسبه سطح تنوع ژنتیکی بین هر یک از این جدایه‌ها از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد و دندروگرام ترسیم گردید. بر اساس داده‌های SSR، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌های نژاد IM008 بین ۰/۵ تا ۱، در نژاد Holand-737 بین ۰/۵ تا ۰/۹ و در نژاد Canada-10 بین ۰/٤ تا ۰/۹ متغیر بود. سطح تنوع ژنتیکی بین۲۳ جدایه هموکاریون نیز با استفاده از ماتریس فاصله ژنتیکی محاسبه گردید، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین ۰/۳تا ۱ متغیر بود (شکل۳).

جدول ٢- نتایج خلاصه شده آزمون میوه‌دهی و نشانگرهای SSR.

Table 2- Summation results of Fruiting test and SSR markers.

Holand-737 isolates	Fruiting	No. hetero locus	No. homo locus	Canada-10 isolates	Fruiting	No. hetero locus	No. homo locus	IM008 isolates	Fruiting	No. hetero locus	No. homo locus
1	+	0	10	1	+	10	0	1	+	0	10
2	+	9	1	2	+	10	0	2	+	10	0
3	+	0	10	3	+	0	10	3	+	0	10
4	+	9	1	4	−	9	1	4	−	10	0
5	+	9	1	5	+	10	0	5	−	9	1
8	−	9	1	6	+	1	9	6	+	0	10
9	+	10	0	7	−	9	1	7	+	0	10
10	+	9	1	8	+	9	1	8	+	10	0
11	+	1	9	9	−	9	1	9	+	10	0
12	+	1	9	10	−	9	1	10	+	0	10
13	+	10	0	11	+	9	1	11	+	0	10
14	+	10	0	12	+	10	0	12	+	10	0
15	+	10	0	13	+	10	0	13	+	10	0
16	+	1	9	14	+	9	1	14	+	10	0
17	+	9	1	15	+	0	10	15	+	3	7
18	+	1	9	16	+	0	10	16	−	10	0
19	+	10	0	17	+	0	10	17	+	0	10
20	+	9	1	18	+	0	10	18	+	0	10
21	+	6	4	19	+	0	10	19	+	0	10
22	+	6	4	20	+	9	1				
23	+	6	4	21	+	1	9				
24	+	9	1	22	+	0	10				
25	+	10	0	23	+	9	1				
26	+	10	0	24	+	1	9				
27	+	0	10	25	+	6	4				
28	+	10	0	26	+	10	0				
				27	+	10	0				



شکل ۱- نتایج آزمون میوه‌دهی: **A**) میوه‌دهی کامل در دو تکرار، **B**) یکی از تکرارها دارای اندام میوه‌دهی کامل و تکرار دیگر دارای میوه ریز می‌باشد، **C**) جدایه‌ای را نشان می‌دهد که در هیچ یک از تکرارها اندام میوه‌دهی تولید نکرده است، در **D**) جدایه‌ای که میسلیوم آن از رشد بسیار ضعیفی برخوردار می‌باشد به حدی که قادر به سفید کردن کامل خاک پوششی نبود.

Figure 1- Fruiting results: A) full fruiting in two replicates, B) whole fruiting body in one replicate and in the other replicate had small fruit, C) this showed one isolate that it did not generate fruiting body in none replicates, and D) this showed one isolate that it grow weekly even it is not able to grow on casing soil.

بررسی احتمال خطا در تشخیص هموکاریونی با کمک نشانگرهای SSR مورد مطالعه

در این مطالعه تعداد ۱۰ جفت آغازگر SSR مورد شناسایی قرار گرفتند که بر روی ۹ کرموزوم مختلف از ۱۳ کرموزوم هاپلوئید قارچ *A. bisporus* شناسایی شدند. تمامی کرموزوم‌ها هریک حامل یک نشانگر بودند و تنها کرموزوم‌های ٤، ٥، ۱۰ و ۱۳ فاقد نشانگر شناخته شدند. از آنجایی که نشانگرهای SSR مورد بررسی در این تحقیق ۹ کرموزوم از ۱۳ کرموزوم هاپلوئیدی این گونه را پوشش می‌دادند، می‌توان دریافت که حضور تنها یک شاهد بر دی‌کاریونی نمونه مورد بررسی (ظهور دو باند) منجر به اثبات هتروکاریونی نمونه خواهد بود. این امر حداقل در ۹ کرموزوم پوشش داده شده در این پژوهش بوسیله ۱۰ آغازگر بکار گرفته شده قابل اثبات است. لیکن در صورت عدم ظهور شاهدی بر دی‌کاریونی (ظهور تک باند در تمام موارد) اگر چه هتروکاریونی نمونه قابل اثبات نیست، اما همچنان ممکن است هتروکاریونی در چهار کروموزوم دیگر قابل اثبات باشد. بعلاوه در خصوص هموکاریونی نمونه نیز نمی‌توان تصمیم قطعی گرفت. با این حال شواهد بیشتری برای هتروکاریونی نمونه نسبت به هموکاریونی وجود دارد و احتمال نتیجه‌گیری در خصوص هموکاریون بودن نمونه حتی با فرض

برابری احتمال ظهور تک باند و دو باند در هر جایگاه (½ : ½) بیشتر خواهد بود. مقدار خطا در این تصمیم‌گیری با توجه به توزیع دو جمله‌ای به صورت زیر قابل محاسبه تقریبی است:

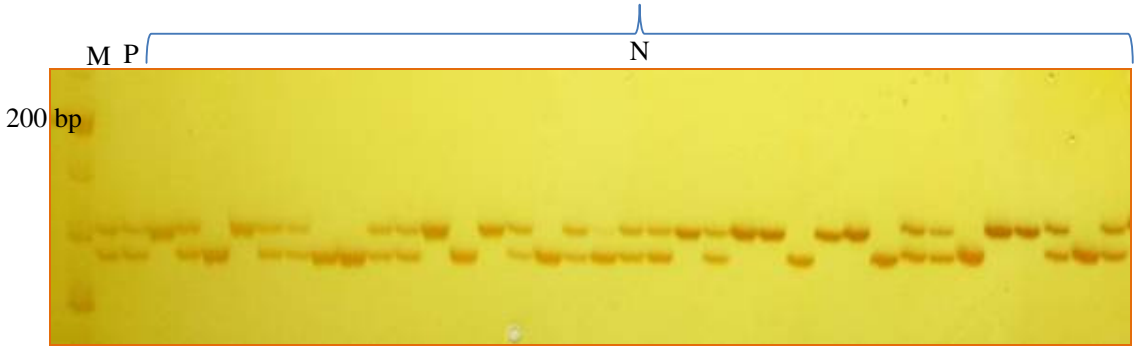
$$(a+b)^{13}=1a^{13}+13a^{12}b^{1}+78a^{11}b^{2}+286a^{10}b^{3}+715a^{9}b^{4}+1287a^{8}b^{5}+1716a^{7}b^{6}+1716a^{6}b^{7}+1287a^{5}b^{8}+\underline{715a^{4}b^{9}+286a^{3}b^{10}+78a^{2}b^{11}+13a^{1}b^{12}}+1b^{13}$$

که در آن a برابر است با احتمال ظهور دو باند (دی‌کاریونی) و b برابر است با احتمال ظهور تک باند (هموکاریونی) که با فرض فوق هر یک را معادل ½در نظر می‌گیریم.

با در نظر گرفتن هر یک از کروموزوم‌های مشخص شده در آنالیز مارکری محاسبه احتمال نیازی به ضرایب فوق در توزیع دو جمله‌ای نداشته و برابر است با:

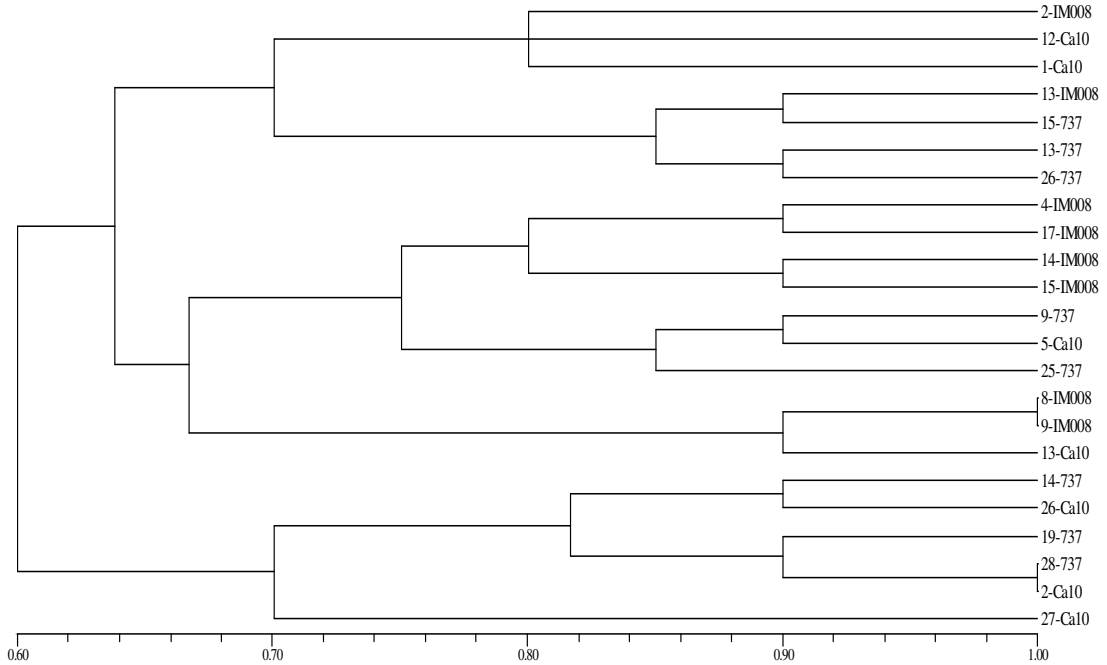
$$1a^{4}b^{9}+4a^{3}b^{10}+6a^{2}b^{11}+4a^{1}b^{12}= (½)^{4}\ (½)^{9}+4(½)^{3}\ (½)^{10}+6(½)^{2}(½)^{11}+4(½)^{1}(½)^{12} = 0.00183 \approx 0.18\%$$

لازم به ذکر است که بر اساس منابع موجود، تمایل به هتروکاریونی حتی بیش از هموکاریونی است (May& Royse, 1982) و این سبب می‌شود که احتمال خطا در این تصمیم‌گیری که نمونه مورد بررسی هموکاریون بوده است حتی به کمتر از این مقدار تقلیل یافته و با احتمال بالاتری – حتی بیش از ٩٩/٨ درصد – نسبت به قطعیت هموکاریون پس از اجرای آزمایش با این ١٠ آغازگر دست یابیم.



شکل ٢- الگوی باندی ایجاد شده توسط آغازگر AbSSR ٣٦ بر روی ژل پلی اکریل آمید، M: سایز مارکر 20bp، P: شاهد هتروکاریون، N: جدایه‌های تک اسپور.

Figure 2- Banding patterns were generated by AbSSR 36 primer on polyacrylamide gel, M: DNA ladder 20 bp, P: Heterokaryon Control, N: Single-spore isolates.



شکل۳- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA برای ۲۳ جدایه هموکاریون قارچ *A. bisporus* با استفاده از نشانگرهای SSR.

Figure 3- UPGMA dendrogram presentation for SSR markers differentiation of 23 homokaryon isolates of *A. bisporus*.

بحث

هر یک از نشانگرهای SSR مورد استفاده در مطالعه حاضر، تنها دارای یک جایگاه در سراسر ژنوم *A. bisporus* می‌باشند، در نتیجه انتظار می‌رفت از هر یک از نشانگرهای مورد استفاده، دو باند قابل امتیازدهی در والد هتروکاریون مادری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود حاصل شود که حضور این دو باند نشان‌دهنده وجود دو هسته غیرخواهری در هر واحد سلولی و ظهور تک باند نشان از حضور یک نوع هسته خواهری در هر واحد سلولی نتاج می‌باشد. نشانگرهای RAPD نیز که در جداسازی همکاریون‌ها استفاده شده‌اند کاهش تعداد باند را در جدایه‌های مستعد هموکاریون نشان دادند ولی احتمال جداسازی هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها در نشانگر RAPD ۹۰ درصد گزارش شده است (Kavousi *et al.* 2008) درحالی که در مطالعه حاضر نشانگرهای SSR با احتمال بالای ۹۹ درصد هموکاریون‌ها را مشخص می‌نماید و تکرار پذیری بالایی نیز دارند.

با توجه به اینکه آزمون میوه‌دهی بر این اساس استوار است که میسلیوم‌های هموکاریوتیک عقیم بوده و اندام باردهی تولید نمی‌کنند و میسلیوم هتروکاریوتیک بارور بوده و اندام باردهی ایجاد می‌کنند (Kerrigan *et al.*, 1992; Khush *et al*, 1992)، در نتیجه انتظار

می‌رفت طبق این آزمون جدایه‌هایی که اندام باردهی حاصل نکرده‌اند، هموکاریون باشند و جدایه‌هایی که در آن‌ها اندام باردهی تشکیل شده است هتروکاریون باشند اما با مقایسه نتایج آزمون میوه‌دهی و نتایج حاصل از نشانگر SSR مشخص گردید که این دو نتایج با یکدیگر مغایرت دارند چرا که برخی از جدایه‌ها که در آزمون میوه‌دهی، میوه‌دهی کامل در آن‌ها صورت گرفته بود و گمان می‌رفت میسلیوم آن‌ها هتروکاریوتیک باشد، در الگوی باندی SSR متناظر آن‌ها، در تمامی جایگاه‌ها به صورت هموآللیک بودند. برخی دیگر از جدایه‌ها که در آزمون میوه‌دهی، اندام میوه‌دهی تولید نکردند و به عنوان جدایه هموکاریوتیک در نظر گرفته شدند، در نتایج نشانگر SSR، در تمامی جایگاه‌های بررسی شده آن‌ها با ۱۰ آغازگر بصورت کاملاً هتروآللیک بودند. این نتایج بیانگر این واقعیت است که آزمون میوه‌دهی برخلاف نشانگر SSR، علاوه بر وقت‌گیر و پرهزینه بودن، دارای دقت چندانی نیز نمی‌باشد (Kerrigan *et al*., 1992; Khush *et al*, 1992).

از آنجایی‌که عواملی به جز سطح پلوئیدی و سازگاری آمیزشی شرایط محیطی و هموزیگوسیتی موجود در برخی مکان‌ها می‌توانند بر میوه‌دهی اثر بگذارند به گونه‌ای که امکان میوه‌دهی هموکاریوتیکی و عدم میوه‌دهی هتروکاریوتیکی وجود دارد پس نمی‌توان بر نتایج آزمون میوه‌دهی استناد کرد ولی نشانگر SSR این دو نوع نتاج را با قطعیت بسیار بالا از همدیگر متمایز می‌کند، که نشان‌دهنده توانمندی این نشانگر در تفکیک ارقام هموزیگوس و هتروزیگوس از یکدیگر می‌باشد.

هر سه نژاد تجاری استفاده شده در این مطالعه، به ازای هر آغازگر دارای الگو و طول باند مشابه با یکدیگر بودند، که نشان دهنده شباهت این نژادها با یکدیگر می‌باشد. درصد زیادی از نتاج حاصل از آن‌ها نیز تا اندازه‌ای به یکدیگر شبیه هستند و الگوی باندی شبیه والد خود را نشان می‌دهند. هر چند برخی نتاج در اثر تغییرات کروموزومی حین تقسیم میوز، وقوع کراسینگ‌اور و جابجایی‌های کروموزومی دارای درصد شباهت پایینی با یکدیگر می‌باشند.

نتایج تجزیه کلاستر نشان داد که نه تنها از تلاقی‌های برون نژادی بلکه از تلاقی‌های درون نژادی نیز می‌توان برای تولید هیبرید استفاده کرد زیرا بین جدایه‌های تک اسپور یک نژاد نیز تفاوت و فاصله وجود دارد به طور مثال جدایه‌های ۲ و ٤ از نژاد IM008 دارای تشابه ژنتیکی ۰/۵ می‌باشند که می‌توان این دو جدایه را برای تشکیل هیبرید در تلاقی شرکت داد، چرا که هر چه دو هموکاریون از شباهت کمتری با یکدیگر برخوردار باشند امکان رسیدن به یک هیبرید برتر بیشتر خواهد بود.

منابع

Barroso G, Sonnenberg AS, Van Griensven LJ, Labarere J (2000). Molecular cloning of a widely distributed microsatellite core sequence from the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Fungal Genetics and Biology 31: 115–123.

Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP, Mergeai G (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 10: 77–81.

Callac P, Hocquart S, Imbernon, M, Desmerger C, Olivier JM (1988). *Bsn-t* alleles from french field strains of *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 64: 2105–2110.

Callac P, Imbernon M, Kerrigan RW, Olivier JM (1996). The two life cycles of *Agaricus bisporus*, In: Royes DJ (ed.), Mushroom Biology and Mushroom Products. Proceeding of the second international conference. The Pennsylvania State University, University Park, pp. 57-66.

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.

Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1988). Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (=*A. bisporus*). Applied and Environmental Microbiology 54: 1643-1648.

Dickhardt R (1985). Homokaryotization of *Agaricus bitorquis* (Quel) Sacc and *Agaricus bisporus* (Lange) Imb. Theoretical and Applied Genetics 70: 52-56.

Dutech C, Enjalbert JR, Fournier E, Delmotte FO, Barres B, Carlier J, Tharreau D, Giraud T (2007). Challenges of microsatellite isolation in fungi. Fungal Genetics and Biology 44: 933–949.

Foulongne-Oriol M, Spataro C, Cathalot V, Monllor S. Savoie JM (2010). An expanded genetic linkage map of an intervarietal *Agaricus bisporus* var. *bisporus*× *A. bisporus* var. *burnettii* hybrid based on AFLP, SSR and CAPS markers sheds light on the recombination behaviour of the species. Fungal Genetics and Biology 47: 226–236.

Foulongne-Oriol M, Spataro C, Savoie JM (2009). Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. Applied Genetics and Molecular Biotechnology 84: 1125–1135.

Fritsche G, Sonnenberg AS (1988). Mushroom strains, In: Van Griensven LJLD (ed.), The Cultivation of Mushroom. Rustington Darlington, pp. 101-123.

Horgen PA, Anderson JB (1992). Biotechnology and edible mushroom, In: finkelstein D, Ball C (eds.), Biotechnology and Filamentous Fungi. Butter Worth, Boston, pp. 447-462.

Kavousi HR, Farsi M, Shahriari F (2008). Comparison of random amplified polymorphic DNA markers and morphological characters in identification of homokaryon isolates of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Pakistan Journal of Biological Sciences 11:1771-1778.

Kerrigan RW, Royer JC, Baller LM, Kohli Y, Horgen PA, Anderson JB (1993). Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics 133: 225-236.

Kerrigan RW, Baller LM, Horgen PA, Anderson JB (1992). Strategies for the efficient recovery of *Agaricus bisporus* homokaryons. Mycologia 84: 575-579.

Kerrigan RW, Spear MC (1997). Method for production of high proportions of homokaryons in breeding stock of the mushroom *Agaricus bisporus*. US Patent No. 5684228.

Khush RS, Watch MP, Horgen PA (1995). Molecular strategy for Agaricus breeding, In: Kuck U (ed.), The Mycota vol II: Genetic and Biotechnology. Springer-verlag, Berlin, pp. 321-337.

Khush RS, Becker E, Wach M (1992). DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology 58: 2971-2977.

May B, Royse DJ (1982). Confirmation of crosses between lines of *Agaricus brunnescens* by isozyme analysis. Experimental Mycology 6: 283-292.

Mehta KB, Bhandal MS (1994). Genetic improvement in the white button mushroom *Agaricus bisporus*, In: Nair MC, Gokulapala C, Aas L (eds.), Advances in Mushroom Biotechnology. Scientific Publisher, Jodhpur, India, pp. 70-77.

Miller RE (1971). Evidence of sexuality in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Mycologia 63: 630-634.

Miller RE, Kananen DL (1972). Bipolar sexuality in the mushroom. Mushroom Science 8: 713-718.

Nazrul MI, Yin-Bing B (2010). ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricus bisporus*. Current Microbiology 60: 92–98.

Ramirez L, Mueza V, Alfonso M, Barrenechea B, Alfonso L, Pisabarro AG (2001). Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom Agaricus bisporus. FEMS Microbiology Letters 198: 45-48.

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

Singer R, Harris B (1987). Mushroom and Truffles. Koeltz Scientific Books. Germany.

Soltis Lab CTAB DNA extraction protocol (2002). The soltis lab, florida museum of natural history, from http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab

Summerbell RC, Castle AJ, Horgen PA, Anderson JB (1989). Inheritance of restriction fragment length polymorphism in Agaricus brunnescens. Genetics 123: 239-300.

Taylor J, Geiser DM, Burt A, Koufopanou V (1999). The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. Clinical Miccrobiology Reviews 12: 126–146.

Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005). Genic microsatellite markers in plants features and applications. Trends in Biotechnology 23: 48-55.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 11: 1-16.

Zhang R, Hu D, Zhang J, Zuo X, Jiang R, Wang H, Bun Ng T (2010). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 10: 273-275.

SSR markers for screening and estimating genetic distance of homokaryotic single spores in the white button mushroom (*Agaricus bisporus*)

Beyrati M.[1], Malekzadeh-Shafaroudi S.[2], Malekzadeh K.[3*], Mirshamsi Kakhki A.[4]

[1]MSc Student in Agricultural Biotechnology, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[2]Department of Biotechnology and Plant Breeding ,Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
[3]Industrial Fungi Biotechnology Research Department, ACECR, Mashhad branch, Iran.
[4]Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

Interspecies hybridization is considered as the most important tools for improving genetic characteristics of *Agaricus bisporus*, which require having compatible homokaryons to cross. One challenge is low percentage of homokaryons among the basidiospores because of the secondary homothalism of this mushroom. Therefore, selection and confirmation of homokaryons among single spore isolates has always been involved with laborious efforts and researchers struggle with it. In this study, we attempted to develop a high-throughput method with high accuracy for screening and confirmation of homokaryons. We used 10 SSR markers -that represented nine linkage map groups of *Agaricus bisporus*-. Of 71 isolates, several isolates showed two bands as the same as those that heterokaryotic parents did, while some of them showed only one band. We were able to divide the isolates into two main groups: homoallelic and heteroallelic. The homoallelic group included 23 isolates that were monoallelic in the whole sites; which were thus confirmed as homokaryons. Further, the findings of the molecular markers were compared to the observations of a fruiting test. The results revealed that isolates that were confirmed by SSR to be heterokaryotic did not produce fruit bodies in the fruiting test. These findings obviously suggested that fruiting tests are less reliable than SSR markers. Genetic variation among 23 putative homokaryons was also calculated with the NTSYSpc software. The genetic similarity was variable between 0.3-1 among the isolates. The isolates were divided into two main groups by dendrogram. The results showed that these 10 SSR markers are able to detect homokaryons with a probability rate over 99 percent.

Key words: *white button mushroom, homokaryon, heterokaryon, microsatellite marker, hybrid.*

[*] Corresponding Author: Malekzadeh K. Tel:09171279387 Email: khalil.malekzadeh@gmail.com