ویژه نامه دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران

بررسی امکان جداسازی هموکاریونهای قارچ خوراکی دکمه ای سفید با استفاده از نشانگر SSR

مکیه بیراتی*[1]، خلیل ملک‌زاده[2]، سعید ملک‌زاده شفارودی[3]، امین میرشمسی کاخکی[3]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- عضو هیات علمی گروه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی واحد مشهد

۳- استادیاران گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Email: m.beyrati@gmail.com

چکیده

اصلاح و آنالیزهای ژنتیکی در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید مستلزم در اختیار داشتن جدایه-های هموکاریون می‌باشد، اما به دلیل چرخه زندگی خاص این قارچ – هموتالیسم ثانویه – تنها درصد کمی از بازیدیوسپورهای حاصله به صورت هموکاریون می‌باشند و تاکنون هیچ نشانگر مطمئنی برای تشخیص این جدایه‌ها از جدایه‌های هتروکاریون گزارش نشده است. در این مطالعه از ۱۰ نشانگر هم‌بارز ریزماهواره(SSR) که دارای تکرارپذیری و چندشکلی بالایی بودند جهت جداسازی هموکاریون‌ها استفاده شد. از ۷۱ جدایه‌ی مورد آزمون برخی همانند والد مادری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود دارای دو باند و برخی دیگر تنها یکی از باندهای والدی را دارا بودند که بر این اساس جدایه‌ها در دو گروه کلی هتروآللیک و هموآللیک قرار گرفتند. از گروه هموآللیک، ۲۳ جدایه که در تمامی جایگاه‌های بررسی شده الگوی باندی تک باند نشان دادند جداسازی و به عنوان جدایه هموکاریون در نظر گرفته شدند.با مقایسه نتایج به دست آمده از نشانگرSSR و آزمون میوه‌دهی مشخص شد نتایج حاصل از آزمون میوه‌دهی در مقایسه با نتایج نشانگر SSR از اطمینان کمتری برخوردارند چرا که میوه‌دهی هموکاریوتیکی دربرخی جدایه‌ها که هموکاریون بودن آن‌ها توسط نشانگر SSR تأیید شده بود و بالعکس عدم میوه‌دهی هتروکاریوتیکی در جدایه‌هایی که هتروکاریون بودن آن‌ها توسط نشانگر SSR تأیید شده بود، مشاهده گردید. نتایج نشان دادند که با استفاده از این نشانگر می‌توان با احتمالی بیش از ۹۹/۸ درصد نسبت به قطعیت هموکاریون پس از اجرای آزمایش با ۱۰ آغازگر دست یافت.

واژه‌های کلیدی

قارچ خوراکی دکمه¬ای سفید،

نشانگر ریزماهواره،

SSR،

هموکاریون

مقدمه

به رغم ارزش تغذیه‌ای و اقتصادی قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید در مقایسه با دیگرگیاهان زراعی با ارزش، تلاش کمی برای بهبود ژنتیکی نژادهای آن صورت گرفته است. یکی از عمده‌ترین این دلایل، چرخه زندگی این قارچ یعنی هموتالیسم ثانویه است که در ۹۰ درصد موارد، بازیدیوسپورهای حاوی دو هسته هاپلوئید از نظر تیپ آمیزشی متفاوت بوده اما از نظر جنسی سازگارند منجر به تشکیل اندام باردهی می‌شوند. در موارد نادری اسپورهای هموکاریون حاصل می‌شود(۶، ۱۰، ۱۲ و ۱۳). تلاقی بین هموکاریون‌ها و گزینش از میان نتاج در واقع اصلی‌ترین و کارآمدترین روش به نژادی در قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشد که برای انجام برنامه به نژادی مبتنی بر این روش، ابتدا باید جدایه‌های هموکاریون را بدست آورد سپس آنها را در یک برنامه مشخص و هدف‌دار با هم تلاقی داده و در نهایت نتاج حاصل از تلاقی را مورد گزینش و ارزیابی قرار داد. ولی با توجه به درصد پائین هموکاریونها و نیز عدم تشخیص مورفولوژیکی این جدایه‌ها از هتروکاریونها، برخی تلاش‌های اصلاحی معطوف افزایش راندمان جداسازی و گزینش هموکاریون‌ها شده است(۶، ۷، ۹، ۱۲ و ۱۳). یکی از معیارهایی که به منظور به‌گزینی هموکاریون‌ها در این قارچ مورد استفاده قرار گرفته است استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی چون آزمون میوه‌دهی، سرعت رشد و تیپ رشدی پرگنه می‌باشد ولی این روش‌ها بسیار وقت‌گیر، پرهزینه و غیر قابل اطمینان می‌باشند (۶، ۹، ۷ و ۱۳). به همین دلیل به تدریج استفاده از تکنولوژی‌های نوین جداسازی چون استفاده از نشانگرهای مولکولی مرسوم گردید. نشانگرهایی چون RFLP، RAPD و ISSR هرکدام برای جداسازی هموکاریون‌ها به کار رفتند ولی هریک دارای محدودیت‌هایی بودند(۳، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۳) به همین دلیل استفاده از نشانگری که محدودیت‌های نشانگرهای قبلی را نداشته باشد و اطلاعات مفید بیشتری در اختیار قرار دهد ضروری به نظر می‌رسد، از این رو از نشانگر هم بارز SSR که از نظر تکنیکی راحت و دارای تکرارپذیری و پلی‌مورفیسم بالایی است و امکان گزینش جدایه‌های هموکاریون را در مدت زمان کوتاه‌تر و با فراوانی بالاتری فراهم می‌کند در این مطالعه استفاده گردید(۱، ۲ و ۵).

مواد و روش‌ها

نژادهای قارچی: از سه نژاد IM008، Holand-737 و Canada-10 قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید که از مرکز زیست فن‌آوری قارچ‌های خوراکی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه گردید، استفاده شد.

تهیه جدایه‌ها: پس از تهیه نقش اسپور از هر یک از نژادها، مایع تعلیقی غلیظی از اسپورها تهیه گردید و در هر پتری حاوی محیط کشت PDAحدود ۱۵۰۰۰ اسپور از این مایع تعلیقی کشت گردید که پس از تندش اسپورها، پرگنه‌های رشد یافته به محیط کشت جدید منتقل شدند. پس از گذشت یک ماه از زمان جدا شدن جدایه های تک اسپور، ۷۱ جدایه که دارای رشد کندتری نسبت به سایر جدایه‌ها بودند جداسازی شدند.

آزمون میوه دهی: پس از تهیه کمپوست و اسپاون، کیسه های پلاستیکی کمپوست با اسپاون قارچ در ۳ تکرار تلقیح و در شرایط رطوبتی مناسب قرار داده شدند تا زمانی که سطح کمپوست بطور کامل توسط هیف‌ها پوشیده شد پس از این مرحله به منظور تشکیل ساختارهای ته سنجاقی، خاکدهی صورت گرفت و تا پایان دوره رسیدگی کامل قارچ، در شرایط دمایی و رطوبتی مناسب قرار داده شدند .

استخراج DNA: به روش CTAB (۱۱) انجام شد .

آنالیز SSR: واکنش‌های PCR-SSR با استفاده از ۱۰ آغازگر (۵) (جدول ۱) برای ۷۱ تک اسپور جداسازی شده و نمونه‌های مادری به عنوان شاهد انجام شد. در مرحله واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سا نتی‌گراد و به مدت ۳ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل که شامل ۴۵ ثانیه با دمای ۹۴ و پس از آن بر اساس دمای اتصال هر آغازگر (۵۵ و یا ۵۸) ۴۵ ثانیه مرحله اتصال و مرحله تکثیر به مدت ۳۰ ثانیه با دمای ۷۲ درجه سانتی-گراد انجام گرفت. فراورده های PCR-SSR درون چاهکهای ژل آکریل‌آمید ۸ درصد ریزش شدند.

جدول۱. لیست آغازگرهای SSR مورد استفاده در قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید

آغازگر	AbSS R04	AbSS R06	AbSS R09	AbSS R23	AbSS R36	AbSS R45	AbSS R54	AbSS R58	AbSS R62	AbSS R65
دمای اتصال	55	55	58	58	55	58	58	58	58	58

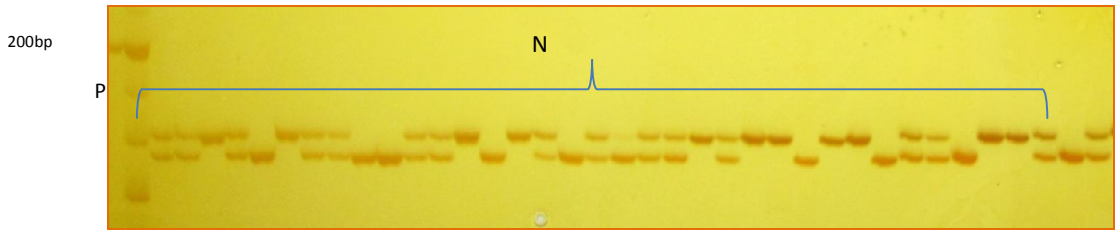
نتایج و بحث:

نتایج آزمون میوه‌دهی: از ۷۱ جدایه تک اسپور کندرشد از سه نژاد مورد بررسی، ۶۱ جدایه در حداقل دو تکرار اندام باردهی تولید کردند و در ۱۰ جدایه علی‌رغم اینکه میسلیوم رویشی آنها سطح خاک پوششی را سفید کرد ولی پس از شوک سرمایی میوه‌ای حاصل نشد.

مشاهدات الگوهای باندی با کمک نشانگر مولکولی ریزماهواره: با مشاهده نتایج حاصل از ژل پلی آکریل آمید مشخص شد که هر یک از آغازگرهای استفاده شده در هر سه والد هتروکاریون که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بودند، دارای دو باند قابل امتیازدهی می‌باشند، برخی نمونه‌ها الگوی باندی شبیه والد هتروکاریون خود- حضور دو باند- و برخی دیگر تنها یکی از دو باند والدی را دارا بودند(شکل ۱).

۱۰ آغازگر استفاده شده بطور کلی ۲۰ باند واضح (با پلی مورفیسم ۱۰۰٪) حاصل شد که باند با اندازه بین ۲۲۰-۱۴۷ ایجاد کردند.

M



شکل ۱: تصویر شماتیک ژل پلی اکریل آمید نشان دهنده‌ی الگوی باندی آغازگر AbSSR ۳۶ در *A.bisporus*.
M سایز مارکر 20bp، P شاهد هتروکاریون، N جدایه‌ها.

با توجه به نتایج خلاصه شده نشانگر SSR موجود در جدول ۲، جدایه‌ها در دو گروه کلی هتروآللیک و هموآللیک قرار گرفتند که ۲۳ جدایه که در تمامی جایگاه‌های بررسی شده الگوی باندی تک باند نشان دادند در گروه هموآللیک دسته‌بندی شدند و به عنوان جدایه هموکاریون در نظر گرفته شدند و مابقی جدایه‌ها که دارای حداقل ۱ جایگاه هتروزیگوس بودند به عنوان جدایه‌های هتروآللیک دسته‌بندی شدند. 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 (۶، ۹، ۱۰ و ۱۳).

جدول ۲. نتایج خلاصه شده آزمون میوه‌دهی و نشانگرهای SSR

شماره جدایه‌های نژاد Holand-737	میوه-دهی	تعداد جایگاه هموزیگوس	تعداد جایگاه هتروزیگوس	شماره جدایه-های نژاد Canada-10	میوه-دهی	تعداد جایگاه هموزیگوس	تعداد جایگاه هتروزیگوس	شماره جدایه‌های نژاد IM008	میوه دهی	تعداد جایگاه هموزیگوس	تعداد جایگاه هتروزیگوس
۱	+	۰	۱۰	۱	+	۱۰	۰	۱	+	۰	۱۰
۲	+	۹	۱	۲	+	۱۰	۰	۲	+	۱۰	۰
۳	+	۰	۱۰	۳	+	۰	۱۰	۳	+	۰	۱۰
۴	+	۹	۱	۴	–	۹	۱	۴	–	۱۰	۰

۵	+	۹	۱	۵	+	۱۰	۰	۵	–	۹	۱
۸	–	۹	۱	۶	+	۱	۹	۶	+	۰	۱۰
۹	+	۱۰	۰	۷	–	۹	۱	۷	+	۰	۱۰
۱۰	+	۹	۱	۸	+	۹	۱	۸	+	۱۰	۰
۱۱	+	۱	۹	۹	–	۹	۱	۹	+	۱۰	۰
۱۲	+	۱	۹	۱۰	–	۹	۱	۱۰	+	۰	۱۰
۱۳	+	۱۰	۰	۱۱	+	۹	۱	۱۱	+	۰	۱۰
۱۴	+	۱۰	۰	۱۲	+	۱۰	۰	۱۲	+	۱۰	۰
۱۵	+	۱۰	۰	۱۳	+	۱۰	۰	۱۳	+	۱۰	۰
۱۶	+	۱	۹	۱۴	+	۹	۱	۱۴	+	۱۰	۰
۱۷	+	۹	۱	۱۵	+	۰	۱۰	۱۵	+	۳	۷
۱۸	+	۱	۹	۱۶	+	۰	۱۰	۱۶	–	۱۰	۰
۱۹	+	۱۰	۰	۱۷	+	۰	۱۰	۱۷	+	۰	۱۰
۲۰	+	۹	۱	۱۸	+	۰	۱۰	۱۸	+	۰	۱۰
۲۱	+	۶	۴	۱۹	+	۰	۱۰	۱۹	+	۰	۱۰
۲۲	+	۶	۴	۲۰	+	۹	۱				
۲۳	+	۶	۴	۲۱	+	۱	۹				
۲۴	+	۹	۱	۲۲	+	۰	۱۰				
۲۵	+	۱۰	۰	۲۳	+	۹	۱				
۲۶	+	۱۰	۰	۲۴	+	۱	۹				
۲۷	+	۰	۱۰	۲۵	+	۶	۴				
۲۸	+	۱۰	۰	۲۶	+	۱۰	۰				
				۲۷	+	۱۰	۰				

از آنجایی که نشانگرهایSSRمورد بررسی در این تحقیق ۹ کرموزوم از ۱۳ کرموزوم هاپلوئیدی این گونه را پوشش می‌دادند(۴)، 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. بنابراین مقدار خطا در این تصمیم گیری با توجه به توزیع دو جمله‌ای به صورت زیر قابل محاسبه تقریبی است:

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

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 ½ در 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:

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

بنابراین می‌توان با احتمال مناسبی – حتی بیش از ۹۹/۸ درصد – نسبت به قطعیت هموکاریون پس از اجرای آزمایش با این ۱۰ آغازگر دست یافت

منابع و ماخذ:

1. Barroso , J.R., Sonnenberg, A.S.M., Van Griensven, L.J. L.D and Labare re, J. 2000. Molecular Cloning of a Widely Distributed Microsatellite Core Sequence from the Cultivated Mushroom Agaricusbisporus. Fungal Genetics and Biology. 31: 115–123.

2. Benbouza, H., Jacquemin , J.M., Baudoin , J.P., Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol.Agron. Soc. Environ. 10 (2): 77 – 81

3. Castle, A.J,.Horgen, PA. and Anderson, J. B.1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms Agaricusbrunnescens and Agaricusbitorquis. Applied And Environmental Microbiology. 53(4) : 816-822

4. Foulongne-Oriol, M,.Spataro, C,.Cathalot, V., Monllor, S, Savoie, J.M. 2010. An expanded genetic linkage map of an intervarietalAgaricusbisporus 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

5. Foulongne-Oriol, M., Spataro, C. and Savoie, J. M. 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom Agaricusbisporus. ApplMicrobiolBiotechnol . 84: 1125–1135.

6. Kavousi, H.R., Farsi, M., Shahriari, F.2008. coparison of random amplified polymorphic DNA markers and morphological characters in identification of homokaryon isolationes of white botten mushroom.pakistan journal of biological sceince. 11(14):1771-1778.

7. Kerrigan, R.W., Baller, L.M., Horgen, P.A., Anderson, J.B. 1992. Strategies for the efficient recovery of Agaricusbisporushomokaryons. Mycologia. 84(4):575-579.

8. Khush, R,. Becker, E and Wach, M. 1992. DNA Amplification polymorphisms of the cultivated mushroom Agaricusbisporus. Applied And Environmental Microbiology. 58(9): 2971-2977.

9. May, B., Royse, DI. 1982. Confirmation of Crosses between Lines of Agaricusbrunnescens by lsozyme Analysis. Experimental Mycology. 6: 283-292

10. **Nazrul, M.I., Yin-Bing, B. 2010**. ISSR as new markers for identification of homokaryoticprotoclones of Agaricusbisporus.CurrMicrobiol. 60: 92–98.

11. Soltis Lab CTAB DNA extraction protocol. 2002. The soltis lab, florida museum of natural history, on line at: http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab.

12. Summerbell, R.C., Castle, A.J., Horgen, P.A. and Anderson, J.B. 1989. Inheritance of restriction fragment length polymorphismisn Agaricus brunnescens.Genetics. 123: 239-300.

13. Xu, J., Kerrigan, R.W., Horgen, P.A. and Anderson, J.B. 1993. Localization of the mating type gene in Agaricusbisporus. Applied And Environmental Microbiology. 59(9): 3044-3049.

Possible isolation of homokaryones in white button mushroom (*Agaricusbisporus*) using molecular marker-SSR

MakiyeBeyrati[1*], Khalil Malekzadeh[2], Saeid Malekzadeh Shafaroudi[1], Amin Mirshamsi Kakhki[1]
1-Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Department of Industrial Fungi Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad branch

Abstract:

Having homokaryon isolates is the first step in genetic analysis and breeding of *Agaricusbisporus* (Lange). A few percent of basidiospores are homokaryonbecauce of the unusual life cycle of the mushroom, secondary homothalism. Finding reliable marker to detect homokaryonsfrom heterokaryons is still a debated issue. This research designed to apply an efficient, highly polymorphic, reproducible and codominant molecular marker, microsatellite-SSR, to distinguish perfectly between homokaryons and heterokaryons. 71 slow growing isolates selected from 3 cultivated strains. Their heterokaryotic parents utilized as control. 10 tested primers were polymorphic in parental heterokaryons. Presence and absence of polymorphic bands were considered and two general group were divided: homoallelic and heteroallelic. 23 isolates of homoallellic group that studied in 10 uniband sites charachterized as homokaryon.Compareing the results of molecular marker and fruiting test revealed the fruiting test less reliable them SSR marker. Odd results in fruiting test, when the fruit was produced in both monokaryotic and heterokaryotic isolates, is correctable by applying SSR markers. The calculations showed that these 10 SSR marker can detect homokaryon with a confidence more than 99.8 percent.

Key works: White Button Mushroom, microsatellite, SSR, Homokaryon