

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

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

خلیل ملکزاده^{*}، احسان محسنی‌فرد^۱، بنشه جلالزاده مقدم شهری^۱، محمد فارسی^۲

۱- مریبان پژوهش، گروه زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، دانشگاه فردوسی مشهد

Malekzadeh KH^{*1}, Mohsenifard E², Jalalzadeh Moghaddam Shahri B¹, Farsi M²

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 غالباً مشابه‌ای دارند شاخص 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 توanalyse 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 آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفتند و نواحی ITS و IGS ریبوزومی آنها نیز به کمک آغازگرها اختصاصی تکثیر و توالی‌بایی 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 چندشکل (۰/۰۹۵ و ۰/۰۹۲) به ترتیب به آغازگرها ۸۴۱ و ۸۰۹ بیشترین ضرایب چندشکل (۰/۱۰) به ۱۱ آغازگر دیگر تعلق گرفت. کمترین و بیشترین ضرایب شاخص ژنتیکی به ترتیب بین ژنوتیپ‌های P4 و Dezful با ۰/۱۰۰ و ۵۱۲ Yousefi با ۰/۰۹۶ بدست آمد. آغازگرها ۸۴۱، ۸۰۹، ۸۰۸ و ۸۴۲ توانایی جداسازی کلیه ژنوتیپ‌ها را با وجود روابط خویشاوندی نزدیک آنها دارند. از سوی دیگر، نتایج توالی‌بایی نواحی ITS و IGS نشان داد که این نواحی علیرغم عدم قابلیت تفکیک درون گونه‌ای، 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 اثکشتنگاری و ثبت حقوقی نژادهای تجاری درون یک گونه مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
قارچ خوراکی
نشانگرهای مولکولی
DNA
ITS

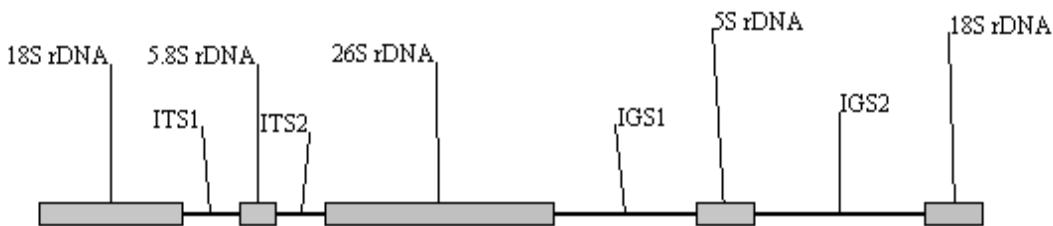
مقدمه

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 معمولاً دارای طول بین ۲۰۰۰ - ۲۰۰ جفت باز هستند (Reddy et al. 2002). نواحی^۱ ITS و^۲ IGS 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 زیر واحد کوچک ریبوزوم و ۵/۸S rDNA) و ITS2 (بین ۵/۸S rDNA و ژن rDNA زیر واحد بزرگ ریبوزوم) هستند و نواحی IGS مناطق بین ژن‌های تکراری rDNA می‌باشند و آنها را از هم جدا می‌نمایند ولی رونویسی نمی‌شوند (شکل ۱). 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 عموماً 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 فیلوزنی انجام شده و در ۳۴ درصد مقاله‌های مبتنی بر نواحی ITS، مطالعات به منظور بررسی روابط فیلوزنی 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 al.

Agaricales راسته 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 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 مورفو‌لوجیکی 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 Castle et al. 1987 (A. *brunneces*) در تفکیک کولتیوارهای قارچ دکمه‌ای (Moore et al. 2001)، از نشانگر RAPD در این ITS-RFLP (Ma and Luo 2002) *Pleurotus* قارچ‌های جنس ITS و IGS در بررسی تنوع قارچ‌های جنس ISSR در تعیین ژنوتیپ (Chillali et al. 1998) از نشانگر *Armillaria* 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،

¹ Internal transcribed spacer² Intergenic spacer region



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

امتیازدهی ایجاد نکردن، حذف شدند). انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم‌های ۲۰ میکرو‌لیتری شامل ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR (۱X)، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۰۲ mM)، کلرید منزیم (۰/۵ mM)، آغازگر (۰/۵ pM) و یک واحد آنزیم پلیمراز Genet bio (Genet bio) انجام گرفت. زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف تکثیر به صورت: واسرت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر شامل واسرت 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 غلاظت ۱/۷ درصد انجام شد. ژل‌ها در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد رنگ آمیزی گردید و سپس در دستگاه ترانسلومنیتور TCR-20M vilber lourmat شد. به منظور تعیین فواصل ژنتیکی نژادها الگوی باندی حاصل از 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 کلاستریندی با روش UPGMA در نرم افزار NTSYS.2 انجام شد. شاخص^۱ PIC برای آغازگرهای ISSR به عنوان یک نشانگر غالب براساس معادله زیر محاسبه شد

$$PIC_i = 1 - p_i^2 - q_i^2 \quad (\text{Haouari and Ferchichi 2008})$$

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

(al. 2002; Zhang et al. 2006). همچنین بررسی توالی ITS نقش مهمی در مطالعات فیلوجنی 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 (جدول ۱).

استخراج DNA، از میسلیوم‌های رشد یافته در محیط عصاره کمپوست، بر اساس روش (Saghai-Marof 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 ((CT)₈RA) ۸۰۵ ((TA)₈C) ۸۴۳ ((TG)₈RT) ۸۴۵ ((CT)₈RG) ۸۴۴ ((CT)₈RC) ۸۵۸

^۱ Polymorphism information content

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

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

جدول ۲- آغازگرهای ISSR معرفی شده برای تفکیک ژنوتیپ‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای

نام آغازگر	نمای اتصال (°C)	نام آغازگر	نمای اتصال (°C)	نام آغازگر	نمای اتصال (°C)
۸۰۷	(AG) ₈ T	۴۶	۸۳۵	(AG) ₈ YC	۵۱
۸۰۸	(AG) ₈ C	۴۹	۸۳۶	(AG) ₈ YA	۴۹
۸۰۹	(AG) ₈ G	۴۹	۸۴۰	(GA) ₈ YT	۴۹
۸۱۰	(GA) ₈ T	۴۷	۸۴۱	(GA) ₈ YC	۵۰
۸۱۱	(GA) ₈ C	۴۸	۸۴۲	(GA) ₈ YG	۵۱
۸۱۲	(GA) ₈ A	۴۷	P39	(CAAGG) ₃	۴۷
۸۳۴	(AG) ₈ YT	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.

White et al. ATCAGACGGATGCGGT -3' استفاده شد (Martin and Rygiewicz 2005). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۶۰ میکرولیتر حاوی ۶۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر PCR (۱X)، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۱۶ mM)، کلرید منزیم (۰/۲۵ 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 واسرتست اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، ۳۰ چرخه تکثیر شامل واسرتست 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

در جمعیت است و شاخص PIC برای یک آغازگر میانگین PIC‌های 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.

جزئیه توالی نواحی و IGS ITS جهت تکثیر کامل ITS از آغازگرهای ITS5: ۵'- ATCAGACGGATGCGGT -3' و ITS4: ۵'- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG -3' و جهت تکثیر ناحیه TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' LR12R: ۵'- آغازگرهای اختصاصی IGS1 ۵SRNA: ۵'- GAACGCCCTAAGTCAGAATCC -3'

جدول ۳- شاخص‌های محاسبه شده برای آغازگرهای ISSR استفاده شده برای بررسی تنوع قارچ خواراکی دکمه‌ای

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

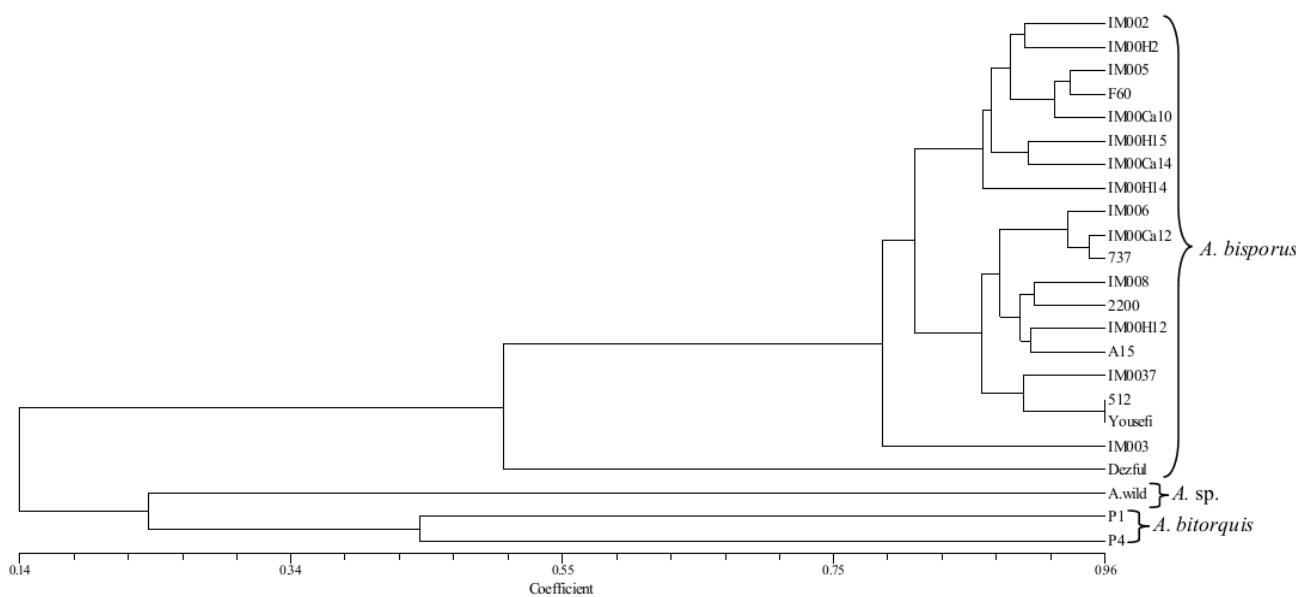
Yousefi و ۵۱۲ بیشترین شباهت (۰/۹۶۱) و نژادهای Dezful و P4 مترین تشابه ژنتیکی (۰/۱) را نشان دادند. جهت نشان دادن قدرت تفکیک هر آغازگر در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، نمودار خوشهای بر اساس الگوی باندی هر آغازگر با روش UPGMA رسم شد. بر اساس خوشبندی انجام شده گونه‌های متفاوت قارچ دکمه‌ای در خوشه‌های جداگانه‌ای 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 کاملاً 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 (شکل ۲) و با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های خواهری نیز در داخل این خوشه پراکنده بودند نشان می‌دهد که تمام ژنوتیپ‌های اصلاحی قرایت نزدیکی با هم دارند و به احتمال زیاد از اجداد یکسانی برخوردار هستند.

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 توالی‌بایی به شرکت Pioneer ارسال شد و توالی‌بایی بر اساس هر دو رشته قطعه تکثیری انجام گرفت. نتایج توالی‌بایی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit (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 درصد 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



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

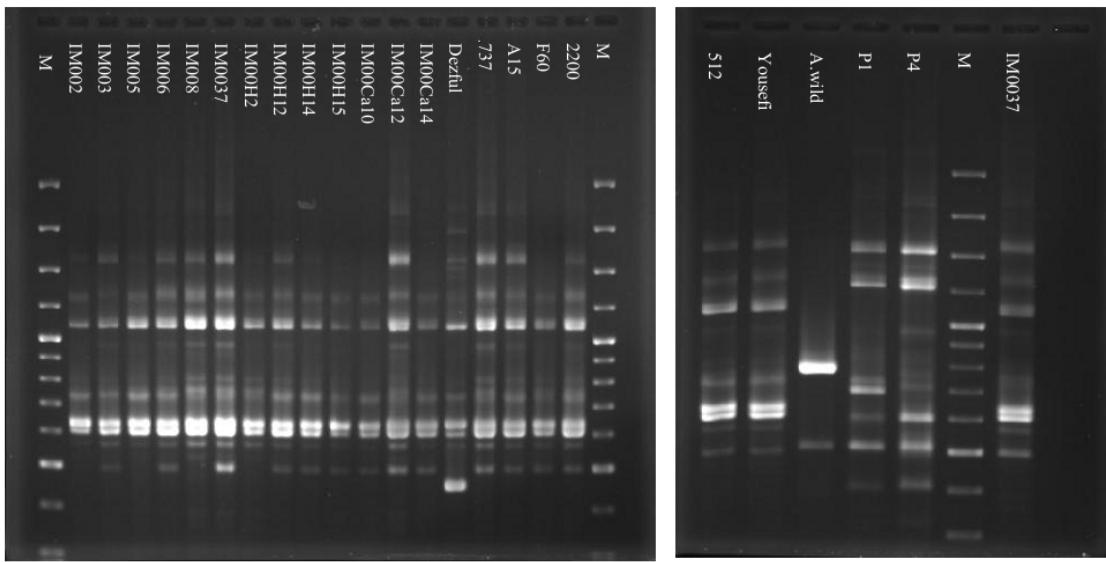
مطالعه چهار آغازگر برای تفکیک نژادها از یکدیگر نیاز بود. دلیل آن را می‌توان به این صورت توضیح داد که نژادهای اصلاح شده در ایران منشا خیلی نزدیکی داشته و حتی تعدادی از آنها خواهر و برادر هستند و بنابراین تنوع ژنتیکی و تنوع نشانگری کمتری نشان می‌دهند.

شانص PIC که در واقع بیانگر ارزش یک نشانگر برای تشخیص چندشکلی در یک جمعیت می‌باشد، بر اساس تعداد آلهای 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 شناخته می‌شود در این پژوهش ۰/۱۸۷ بود که با توجه به اینکه حداقل PIC در نشانگرهای غالب ۰/۵ است (Nagy et al. 2012) نشان‌دهنده این است که اکثر ژنتوتیپ‌های تجاری قارچ خوارکی ایران دارای روابط خویشاوندی نزدیکی هستند (جدول ۳). همانطورکه نتایج نشان می‌دهد در بین آغازگرهای آغازگرهای آغازگرها در بررسی ژنتوتیپ‌های با زمینه ژنتیکی نزدیک قارچ خوارکی دکمه‌ای همچون ژنتوتیپ‌های موجود در ایران باشند.

همچنین بر اساس ضریب شباهت و خوشبندی رسم شده به نظر می‌رسد والد نژادهای اسپوری IM و IM00Ca10 IM00Ca12 IM00Ca14 که نامشخص می‌باشد نیز نژاد ۷۳۷ باشد. همچنین از بین ۱۳ آغازگر منتخب، ۴ آغازگر ۸۰۹ ۸۰۸ ۸۴۱ و ۸۴۲ توانستند تمامی نژادهای مورد آزمایش را از هم مجزا و تفکیک نمایند.

بر اساس نتایج می‌توان استنباط کرد که آغازگرهای ISSR دارای توالی_n (AG)_n (GA) قدرت تفکیک مناسبی را برای جداسازی نژادهای قارچ خوارکی دکمه‌ای دارند و این می‌تواند نشان دهنده این باشد که اولاً این توالی‌ها دارای پراکندگی خوبی در ژنوم این قارچ هستند و ثانیاً 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 کاملاً 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).

در حالی که نتایج ما نشان داد که آغازگر ۸۱۰ کارآبی چندانی ندارد و در عوض آغازگر ۸۰۸ آغازگر مناسب‌تری جهت تفکیک نژادهای موجود در ایران می‌باشد (شکل ۳). به علاوه در این



شکل ۳- نیمرخ ژل الکتروفورز محصولات تکثیری آغازگر ۸۰۸ سایز مارکر ۱۰۰- نمونه شماره IM0037 جهت تطابق باندها در هردو ژل تکرار شده است.

بین ناحیه ITS2 بین گونه‌های *A. bitorquis* و *A. bisporus* ۰/۹۳۳، بین گونه‌های *A. bitorquis* و *A. sp.* ۰/۹۹۱ و بین *A. bisporus* و *A. sp.* ۰/۹۳۳ می‌باشد.

نتایج توالی‌بایی 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 صورتی که عنوان شده که این نواحی دارای ثبات پایینی می‌باشد و جهت تعیین تفاوت‌های بین درون گونه‌ای در قارچ‌ها بهتر از نواحی rDNA می‌باشد (Deng et al. 2008). همچنین نتایج ما با اظهارات (Gmel 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.

توالی‌بایی ناحیه IGS1 به طول تقریبی ۱۲۰۰ جفت باز برای تمام نژادهای *A. bisporus* و نژاد P1 از گونه *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. bisporus* و *A. bitorquis* از لحاظ طول توالی و ترتیب بازها

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 قربات ژنتیکی زیاد که بر روی جمعیت‌ها و شجره‌هایی از انگور، کاهو، گوجه، کاج، ماهی قزل‌آل، ماقیان، 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 درصد یکسان است اما بین گونه‌های مختلف این تفاوت کاملاً آشکار بود بهطوری که هم تفاوت بازی وجود دارد و هم طول این نواحی متفاوت است. طول ناحیه ITS1 در ۲۸۹ *A. bisporus* جفت باز و در گونه‌های ۲۹۳ *A. sp.* و *A. bitorquis* شباهت بین ناحیه ITS1 بین گونه‌های *A. bitorquis* و *A. bisporus* ۰/۹۲۹، بین گونه‌های *A. sp.* و *A. bitorquis* ۰/۹۸۶ و بین *A. sp.* و *A. bisporus* ۰/۹۲۹ می‌باشد.

طول ناحیه ITS2 در ۲۰۸ *A. bisporus* جفت باز و در گونه‌های ۲۱۰ *A. sp.* و *A. bitorquis* شباهت

شکل -۴- هم‌دیفیس‌سازی (alignment) (ITS)، نواحی رنگی نشان دهنده تفاوت بازی بین گونه‌های خارج خوراکی دکمه‌ای می‌باشد.

شکل ۵- هم‌دیف‌سازی (alignment) توالی‌های JTS2 نواحی رنگی نشان دهنده تفاوت بازی بین گونه‌های قارچ خوارکی دکمه‌ای می‌باشد.

مناسب می‌باشد که این موضوع می‌تواند کمک شایانی به پژوهه‌های جمع‌آوری قارچ‌های دکمه‌ای وحشی برای طبقه‌بندی 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 IGS1 و ITS جهت تفکیک نژادی و حتی ثبت نژادها باشد. نواحی IGS1 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.

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

Chillali et al.1998; Martin and Rygiewicz 2005 (Rygiewicz) حاکی از این بود که نواحی IGS دارای تنوع مناسبی برای تشخیص درون گونه‌ای هستند اما توالی یابی 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 حفاظت شده بوده و ابزاری مناسب جهت تفکیک نژادها در این قارچ نمی‌باشد. اما از لحاظ تاکسونومیکی برای تعیین گونه در جنس *Agaricus*

- 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*. Mycosistema 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. Euphytica 128: 9-17.

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.