کاربرد نشانگر مولکولی AFLP در انگشت‌نگاری ژنتیکی و تفکیک نژادی‌های تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای

محمد فارسی (۱)، پریسا قربانی فعال (۲)، بنفشه جلال‌زاده (۳)، خلیل ملک‌زاده (۳)

۱- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۳- عضو هیات علمی جهاد دانشگاهی مشهد، گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی

به دلیل سهولت تکثیر رویشی نژادهای اصلاحی قارچ‌های خوراکی، حفاظت از نژادهای اصلاح شده امری جدی و ضروری است. نشانگرهای مولکولی AFLP به دلیل سرعت، دقت، پوشش بالای ژنوم و نیز ارائه نتایج قابل اعتماد و تکرارپذیری بالا, قابلیت زیادی در انگشت‌نگاری ژنتیکی دارند. در این پژوهش DNAی ژنومی ۱۲ نژاد تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus*، با استفاده از هشت ترکیب جفت آغازگری (*Eco*RI/*Tru*9I)، تکثیر گردید. در مجموع ۵۰۱ باند قابل امتیازدهی ایجاد شد که ۵۴ عدد (۱۰/۸٪) از آنها چند شکل بودند. بیشترین تعداد باند چند شکل (۱۲ باند) با استفاده از ترکیب آغازگری (*E*coRI-CT/ *Tru*9I-TC) و کمترین تعداد باند چندشکل (۲ باند) با استفاده از ترکیب آغازگری (*Eco*RI-CAC/ *Tru*9I-AG) حاصل شد. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها بین ۰/۱۴ تا ۰/۹۵ متغیر بود و دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش UPGMA در نرم افزار Ntsys، سه گروه اصلی را بین ۱۲ نژاد مشخص کرد. با توجه به الگوی انحصاری باندهای حاصل از هشت جفت آغازگر در هر نژاد، تمایز بین آنها میسر بود.

واژه های کلیدی: قارچ دکمه‌ای، نژادهای اصلاحی، ترکیب آغازگری، AFLP، شناسنامه مولکولی

مقدمه

تکثیر ساده و سریع میسلیوم قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* به روش غیرجنسی موجب می‌شود که بتوان بدون کسب مجوز از تولیدکننده اصلی، نژادهای اصلاح شده را براحتی تکثیر نمود، این امر علاوه بر آنکه خلاف حقوق مادی و معنوی تولید کننده می‌باشد تداوم برنامه‌های اصلاحی قارچ‌های خوراکی را دچار مشکل می‌نماید. استفاده از نشانگرهای ژنتیکی روشی قابل اعتماد برای انگشت‌نگاری و ثبت ژنتیکی نژادهای نزدیک به هم می‌باشند. هدف از این پژوهش بررسی امکان دست‌یابی به شناسنامه مولکولی چند نژاد اصلاحی تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای به کمک نشانگر AFLP می‌باشد.

DNAی ژنومی ۱۲ نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای بر اساس روش مبتنی بر CTAB از میسلیوم حاصل از کشت مایع قارچ‌ها انجام شد. پس از انجام سنجش‌های کمی و کیفی، DNA بدست آمده به منظور انجام مراحل انگشت‌نگاری مبتنی برAFLP توسط آنزیم‌های برشی هضم گردید. پس از اتصال آداپتورها به انتهای قطعات برش یافته تکثیر قطعات در دو مرحله پیش انتخابی و انتخابی انجام شد. به منظور مشاهد الگوی باندی حاصل، قطعات تکثیر یافته بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشت در دستگاه الکتروفورز توالی‌یاب بارگذاری و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی گردید. امتیازدهی باندها به صورت (۱) و (۰) به ترتیب برای حضور و عدم حضور باند انجام شد. داده‌ها پس از ورود به نرم افزار Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار Ntsys (version 2.02e) منتقل شدند.

هشت جفت آغازگر برای ۱۲ نژاد قارچ دکمه‌ای سفید، در مجموع ۵۰۱ باند قابل امتیازدهی و ۵۴ باند چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای تکثیر شده و چند شکل به ازای هر جفت آغازگر به ترتیب ۶۲/۶۲ و ۶/۷۵ بود. در این

میان، ترکیب جفت آغازگری (EcoRI-CT/Tru9I-TC) دارای بیشترین تعداد باند چند شکل و ترکیب جفت آغازگری (EcoRI-CAC/Tru9I-AG) دارای کمترین تعداد باند چند شکل بود. بر اساس الگوهای باندی متفاوت، می توان مشاهده کرد که نژادهای اصلاح شده مختلف از همدیگر کاملا متمایز شدند. ماتریس قرابت ژنتیکی بدست آمده و نمودار خوشه‌ای حاصل از آن ، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها را بین ۰/۱۴ تا ۰/۹۵ نشان داد. دندروگرام حاصل از نرم افزار(Ntsys (ver.2.02 به روش UPGMA، دورگ‌های مورد بررسی را با شباهت ژنتیکی ۷۵٪ در سه گروه اصلی جای داد. پژوهش حاضر روشن ساخت که روش AFLP قادر است برای هر نژاد تجاری، الگوهای باندی منحصر به فردی تولید نماید. به این ترتیب می‌توان برای هر نژاد یک شناسنامه‌ی مولکولی منحصر به فرد ایجاد کرد که در آن به وجود باند عدد ۱ و فقدان آن عدد ۰ نسبت داده شود. در این شناسنامه سه جزء جفت آغازگر، اندازه‌ی باند و حضور یا عدم حضور باند وجود دارد که بر اساس آن افراد از یکدیگر کاملا متمایز می‌شوند.

منابع:

گردان, ح‌ر. خاتمی‌راد, م. ذوالعلی, ج. و فارسی, م. ۱۳۸۶. معرفی و ثبت سه نژاد اصلاح شده از قارچ خوراکی دکمه‌ای، *Agaricus bisporus*. مجله دانش کشاورزی، جلد ۱۷، شماره ۲، ص. ۱۸۸- ۱۷۱.

Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.

Yadav M. C. Sharma, RK. Singh, and SK. Mohapatra. 2006. Molecular differentiation of sexually incompatible strains of *Agaricus bitorquis* using RAPD and AFLP markers. Plant Biochemistry and Biotechnology, 15: 2.

Zhuo, Y., Q. Tan, M-J. Chen, H. Cao, Y-N. Jia, and Y-J. Pan. 2006. AFLP analysis of genetics diversity in main cultivated strains of *Lentinula edodes*. Mycosystema, 25: 203-210.

Preparation of AFLP Mediated-Molecular Certificate for 12 Bred Strains of the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*

Abstract

As hybrid spawn is propagated asexually in edible mushrooms, producers may propagate it without the permission of the owner. For the protection of the owner right, there is a great need for a molecular certificate for each commercial line. The high-resolution genotyping method of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis was used to prepare molecular certifications and fingerprinting of 12 lines of *Agaricus bisporus*. AFLP templates were prepared by digestion of *Agaricus* DNA with *Eco***RI** and *Tru***9I** restriction endonucleases and subsequent ligation of corresponding site specific adaptors. A total of 54 polymorphic bands were obtained using eight primer combinations. The largest polymorphic bands (12) were produced by using (E-CT/t-TC) primer combination. Molecular certificates were adjusted through presence (1) and non-presence (0) of polymorphic bands. The 12 Button Mushroom lines were distinctly allocated into three clusters with UPGMA method. These results indicated that AFLP is a fast, highly discriminating and reproducible DNA fingerprinting method in distinguishing bred lines of white button mushroom.

Key words: Button Mushroom, Bred Lines, Primer Combinations, AFLP, Molecular Certificates.