بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) با استفاده از نشانگر RAPD

رودابه راوش[۱]، بهروز شیران[۱] و عزیزالله علوی[۲*] و جورج زرواگیس[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۵/۲۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱/۱۱)

چکیده

به‌منظور تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ شاه صدف(*Pleurotus eryngii*) ۴۵ جدایه قارچ از ۱۰ منطقه مختلف آب و هوایی ایران (استان‌های: اصفهان، چهارمحال و بختیاری، کهکیلویه و بویراحمد، لرستان و فارس) جمع‌آوری شد. جهت تعیین تنوع ژنتیکی از نشانگر مولکولیRAPD استفاده شد و به‌کمک ۱۰ آغازگر تصادفی و پس از واکنش PCR و انجام الکتروفورز ژل آگارز، ۱۸۲ مکان ژنی قابل رؤیت مشخص شدند که در میان آنها ۱۵۰ مکان ژنی (۸۲٪) چند شکلی خوبی را در تمام جدایه‌ها نشان دادند. جدایه‌هایی که دارای میزبان‌های *Ferula assa-foetida* و *Ferula ovina* و *Prangus ferulacea* بودند، در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. همان‌طور که انتظار می‌رفت، نقش منطقه جغرافیایی (از نظر دما و میزان بارندگی) در قرابت ژنتیکی جدایه‌ها دارای اهمیت بود. ۷۱/۳۳ درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و ۲۸/۶۷ درصد تنوع ژنتیکی در بین جمعیت‌ها وجود داشت. نتایج نشان داد که خصوصیات ریخت‌شناختی نمی‌تواند دسته‌بندی مناسبی از جدایه‌های *P. eryngii* بر اساس گیاهان هم‌زیست و مناطق جغرافیایی آنها ارائه دهد و برای نیل به این هدف، استفاده از الگوی RAPD روش سریع و نسبتا"قابل قبولی به‌حساب می‌آید.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی RAPD، قارچ شاه صدف (*Pleurotus eryngii*)، میزبان اختصاصی

مقدمه

قارچ شاه صدف(Oyster mushroom) *Pleurotus eryngii* جزو قارچ‌های خوراکی کلاهک‌دار و متعلق به شاخه Basidiomycota، رده Agaricomycetes و تیره Pleurotaceae می‌باشد و روی ریشه گیاهان تیره چتریان (Apiaceae)، به‌صورت انگل رشد می‌نماید. بخش خوراکی این قارچ بازیدیوکارپ نامیده می‌شود. این قارچ در حوزه مدیترانه (اروپا، شمال آفریقا، آسیای مرکزی، جنوب شوروی سابق، کوه‌های افغانستان و بخشی از هندوستان) می‌روید (۲). در ایران رویشگاه طبیعی این قارچ در مناطق مرکزی، جنوبی و غربی می‌باشد(۱).

زرواکیس و همکاران (۱۴)۴۶ جدایه دیکاریوتیک متعلق به مجموعه گونه‌های *P. eryngii* که میزبان‌های آنها متعلق به پنج جنس مختلف بودند را، با نشانگر RAPD-PCR و تکنیک آیزوزایم، مورد آزمایش قرار دادند. هدف آنها از این تحقیق

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۲. استادیار باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
۳. استاد گیاه‌پزشکی، انستیتو تحقیقات کشاورزی کالاماتا، یونان
* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: azizollaalavi@yahoo.com

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

روشن کردن طبقه‌بندی و ارزیابی تنوع ژنتیکی میان نمونه‌های اروپایی جنس *Pleurotus* مرتبط با چتریان و تعیین گونه‌های آن و هم‌چنین ارزیابی اشتراک میان مشاهدات اکولوژیکی و ریخت‌شناختی بازیدیوماتا، بوده است. این محققان نشان دادند که تعداد باندها می‌تواند به‌عنوان شاخص قابل قبولی، برای تعیین میزبان‌های اختصاصی نژادهای *P. eryngii*، مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه، صحت تجزیه و تحلیل RAPD-PCR بهتر از آنالیز آیزوزایمی بود. تکنیک RAPD مطالعه ساختار جمعیت را در بسیاری از قارچ‌ها که بررسی آنها به‌وسیله نشانگرهای دیگر، مشکل بوده است، ممکن می‌سازد. لوینسون و همکاران (۶) نیز با استفاده از روش RAPD-PCR تنوع ژنتیکی ۱۲ جمعیت (۱۴۴ جدایه) *P. eryngii* را مورد مطالعه قرار دادند، فاصله ژنتیکی میان جمعیت‌ها، رابطه مثبتی با فواصل جغرافیایی نشان داد که با آنالیز هم‌بستگی مکانی تکرارهای RAPD تأیید شد.

این پژوهش با هدف تعیین تنوع ژنتیکی یک مجموعه شامل ۴۵ جدایه قارچ با استفاده از نشانگر RAPD انجام گرفت. اهداف کلی این تحقیق عبارت بودند از: بررسی کارایی نشانگر مولکولی RAPD در آشکار نمودن تنوع بین جدایه‌های قارچ شاه صدف، بررسی ارتباط موقعیت جغرافیایی و شرایط اقلیمی قارچ‌ها با گروه‌بندی آن‌ها، بررسی ارتباط گیاه هم‌زیست قارچ‌ها با گروه‌بندی آنها.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

از نوزدهم فروردین ۱۳۸۴ لغایت پانزدهم اردیبهشت ۱۳۸۴ نمونه‌هایی از ۱۰ منطقه قارچ خیز مربوط به پنج استان جمع‌آوری شدند که عبارت‌اند از: مناطق پیر مهران، دشت زرین و احمد غریب مربوط به استان کهکیلویه و بویراحمد، منطقه فریدن مربوط به استان اصفهان، مناطق قارون، لردگان (شامل نواحی کوه ریگ، سردشت و منگاسه) و بازفت مربوط به استان چهار محال و بختیاری، منطقه الیگودرز مربوط به استان لرستان هم‌چنین منطقه سپیدان مربوط به استان فارس (شکل ۱).

جمع‌آوری جدایه‌های قارچ *P. eryngii* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی آنها تحت شرایط زیر صورت گرفت؛ اندازه قارچ‌ها حتی‌المقدور بزرگ بودند، فاصله نمونه‌برداری حداقل ۲۰ قدم در هر محل بود تا از متفاوت بودن جدایه‌ها اطمینان حاصل شود، پس از قرارگیری در پاکت و شماره‌گذاری، در محفظه سرد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. محل برداشت قارچ برای تعیین گیاه هم‌زیست شماره‌گذاری گردید.

مراحل آزمایشگاهی

نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴°C نگه‌داری شدند. برای خالص سازی نمونه‌ها و به‌دست آوردن میسلیوم خالص، از بافت قارچ کشت خالص تهیه شد و برای تهیه محیط کشت از ۲۴ گرم مالت آگار و یک گرم مخمر در یک لیتر آب مقطر استفاده شد (۶).

بررسی سرعت رشد رویشی و خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های *P. eryngii*

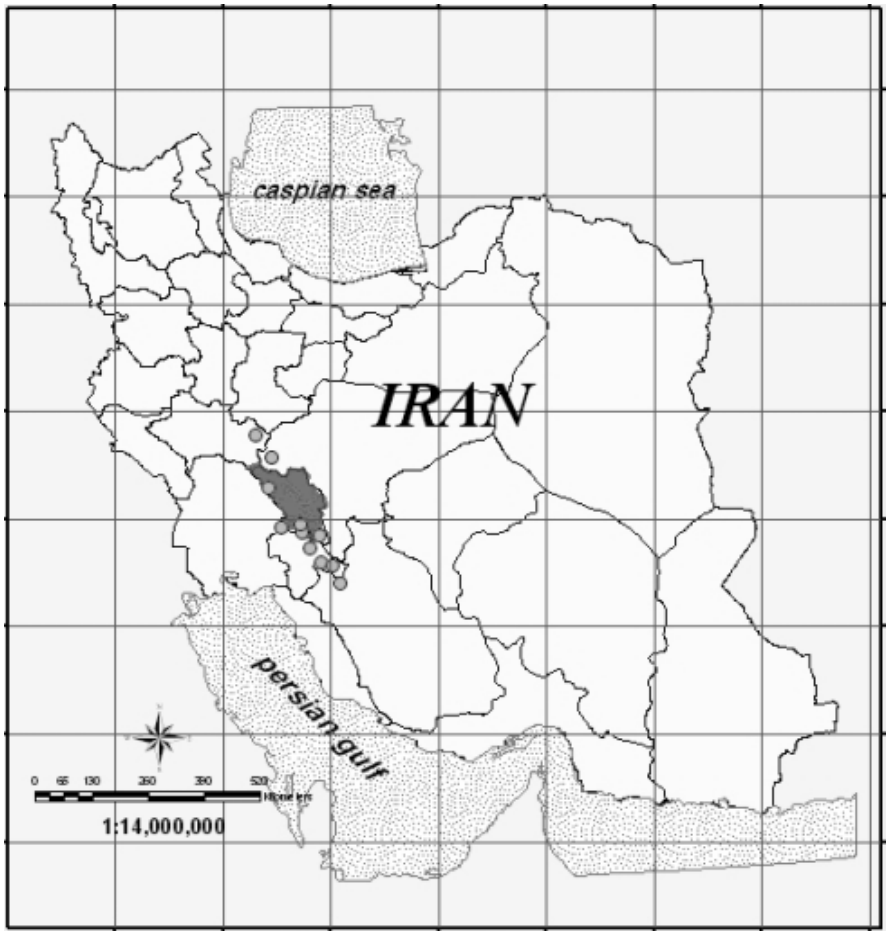
به‌منظور بررسی سرعت رشد رویشی قارچ، از هر جدایه، سه تکرار در نظر گرفته شد و در یک زمان از تمام جدایه‌ها، نمونه برداری انجام شد. به این صورت که قسمت کوچکی از بافت میسلیومی، درست در وسط تشتک پتری جدید قرار داده شد. سپس تشتک‌های کشت شده به ۲۵°C منتقل شدند. آزمایش در طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار صورت گرفت. برای بررسی میزان رشد جدایه‌ها، قطر پرگنه‌های تشکیل شده در دو جهت، به‌طور روزانه و به‌وسیله خط‌کش، اندازه‌گیری شد و بر آن اساس سرعت رشد آنها محاسبه شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS 6.12 انجام شد، هم‌چنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد (جدول ۳).

استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش RAPD-PCR

پس از خالص‌سازی نمونه‌ها، برای استخراج DNA قارچ، به مقادیر زیادی میسلیوم نیاز است که برای

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]



شکل۱. نقشه پراکندگی مناطق جمع‌آوری جمعیت‌های Pleurotus eryngii در این تحقیق

این منظور کشت جدایه‌ها در محیط کشت مایع CYM (Complete Yeast Medium)، انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی با استفاده از ریسه قارچ طبق دستورالعمل راجر و بندیچ (۹)، انجام شد. بدین منظور ۱/۵ تا ۲/۵ گرم میسلیوم قارچ در ازت مایع به پودر تبدیل شد و با مقدار µl ۷۰۰-۵۰۰ بافر استخراج (Tris-HCl (pH=۸) ۵۰ میلی‌مولار، Na_2EDTA ۵۰ میلی‌مولار، SDS ۳٪ وزن به حجم و ProteinaseK ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط شد و به‌مدت یک ساعت در ۶۵°C قرار گرفتند و نهایتاً عمل خالص سازی DNA با استفاده از تیمار RNaseA، فنل، کلروفورم و ایزوآمیل انجام گرفت. DNA خالص پس از رسوب با اتانول در مقدار ۴۰۰-۲۰۰ میکرولیترآب استریل دی یونیزه حل گردید. ارزیابی کیفی و کمی DNA با دو روش الکتروفورز ژل اگارز و روش اسپکتروفتومتری انجام گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز براساس روش ویلیامز و همکاران (۱۱) با تغییر جزیی انجام شد. شرایط دمایی PCR عبارت بود از: واسرشت شدن اولیه DNA الگو به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۴°C، که با ۴۵ سیکل به‌صورت ۱ دقیقه در دمای ۹۴°C (مرحله واسرشت شدن)، ۱ دقیقه در دمای ۳۷°C (مرحله اتصال) و ۲ دقیقه در دمای ۷۲°C (مرحله بسط) ادامه می‌یافت و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بسط نهایی انجام می‌شد. تکثیر DNA در µl ۲۵ مخلوط واکنش در غلظت نهایی ×1 بافر PCR، ۲۰۰ میلی‌مول مخلوط dNTPs، ۱۵ نانو گرم پرایمر ده نوکلئوتیدی، ۰/۷ واحد *Taq* DNAپلی مراز و ۱۵ نانو گرم DNA انجام شد. فراورده‌های حاصل از تکثیر PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE×

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

۰/۵ تفکیک گردید. DNA ۱۰۰bp لدر(Gene Ruler 100bp DNA ladder plus) به‌عنوان نشانگر استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. در پایان از ژل زیر پرتوی فرا بنفش، عکس‌برداری شد. بعد از انجام واکنش‌های تکثیر PCR، حضور و عدم حضور هر نوار خاص با اعداد صفر و یک مشخص شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌های نشانگر مولکولی RAPD به‌کمک نرم‌افزارNTsys 2.02 ، انجام شد. آزمون منتل (۷) برای ضرایب تشابه جاکارد بر اساس روش UPGMA انجام گردید. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) بر اساس داده‌های نشانگر مولکولی RAPD و با استفاده از نرم‌افزار آماری Arlequin ver 2.000 انجام شد.

نتایج و بحث

گیاهان میزبان این جدایه‌ها عبارت بودند از *Smyrniopsis aucheri* (پیکل)، *Ferula ovina* (کما)، *Prangus ferulacea* (جاشیر)، *Kellusia odoratissima* (کرفس کوهی) و *Ferula assa-foetida* (آنغوزه) (جدول ۱). بر اساس داده‌های به‌دست آمده در مورد سرعت رشد جدایه‌ها، جدایه‌های مرتبط با گیاهان جنس‌های *Ferulae* و *Smyrniopsis*، دارای سرعت رشد بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌ها بودند. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی سه نوع بافت مشاهده شد که عبارت بودند از نوع پنبه‌ای، مجاور و میانه. پرگنه‌ها به رنگ‌های سفید شیری، سفید خاکستری و سفید برفی دیده شدند. شکل پرگنه‌ها به‌صورت دایره‌ای، تقریباً دایره‌ای و نامنظم بود و تعدادی از جدایه‌ها دارای خصوصیت تشکیل قطاع بوده‌اند. رشد پرگنه‌ها با لبه دندانه‌دار، صاف، منظم و تقریباً منظم صورت گرفته و پرگنه برخی از جدایه‌ها گوشه‌دار بود. در مجموع خصوصیات ریخت‌شناختی، نتوانستند تقسیم‌بندی روشنی بر اساس فواصل جغرافیایی و خصوصیات اقلیمی، ارائه نمایند. دی‌گیولا و همکاران (۴) نیز در مطالعاتشان به نتایج مشابهی نظیر فقدان تفاوت‌های ریخت‌شناختی در بین گروه‌های طبقه‌بندی شده بر اساس خصوصیات جغرافیایی رسیدند، هم‌چنین آنها تفاوت‌های معنی‌داری در تعداد بازیدیوم و قطر ریسه‌ها، در میان جمعیت‌ها مشاهده کردند. طبق بررسی‌های آنها تعداد بازیدیوم از اجزای مهم تشکیل دهنده عملکرد می‌باشد و در تمام جمعیت‌ها بین ۲ تا ۲۰ عدد متغیر است. بنابراین توصیه می‌شود برای دست‌یابی به اطلاعات بیشتر جهت گروه‌بندی جدایه‌های *P. eryngii*، خصوصیات اندام‌های زایشی مانند رنگ و حالت تیغه‌ها، اندازه اسپورها و اندازه و تعداد بازیدیوم، مورد مطالعه قرار گیرد (۱۴).

سرعت رشد جدایه‌ها با روش دانکن و هم‌چنین با نرم‌افزار SPSS11 و با استفاده از روش میانگین لینکاژی، مورد مقایسه قرار گرفت. بر اساس دندروگرام حاصل (شکل ۴)، جدایه‌ها بر حسب سرعت رشد، به دو گروه اصلی تقسیم شدند. جدایه‌های الیگودرز (۶)، الیگودرز (۴) و پیرمهران (۱۰)، دارای بیشترین سرعت رشد رویشی بر حسب میلی‌متر در روز (۷/۱) بوده‌اند، هم‌چنین جدایه‌های احمد غریب (۱، ۸ و ۱۰)، فلارد (۳) و پیرمهران (۲)، دارای سرعت رشد زیاد (۵/۵ میلی‌متر در روز) ولی کمتر از گروه قبلی بودند. این جدایه‌ها جزو گروه جدایه‌های با سرعت رشد بالا قرار گرفتند. بقیه جدایه‌ها متعلق به گروه اصلی دیگر مربوط به جدایه‌های با سرعت رشد رویشی کمتر بودند. بر اساس این داده‌ها، جدایه‌هایی که روی گیاهان جنس *Ferula* رشد کردند، دارای سرعت رشد بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌ها بودند (جدول ۳).

در این تحقیق جهت انتخاب بهترین آغازگر برای تکثیرDNA قارچ شاه صدف، ۵۵ آغازگر تصادفی که از شرکت Geneset فرانسه تهیه شده بود، مورد ارزیابی قرار گرفت، که از این تعداد، ۱۰آغازگر بر اساس تعداد و وضعیت قطعات تولید شده انتخاب شد. هر آغازگر برای تمام نمونه‌ها، دوبار تکرار شد و نوارهایی که قوی و تکرارپذیر بودند در تجزیه و تحلیل‌های آماری استفاده شدند (شکل ۵). نوارهای ضعیف و نامشخص، هم‌چنین نوارهای بزرگ‌تر از ۳۰۰۰ جفت باز و کوچک‌تر از ۲۵۰ جفت باز در تمام ژل‌ها، نادیده گرفته شد. این

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

جدول۱. گیاهان میزبان مربوط به ۴۵ جدایه قارچ *Pleurotus eryngii*

گیاه میزبان	نام جدایه‌ها
Ferula ovina (کما)	پیرمهران(۸،۵،۱۰،۲،۹)، فلارد(۱)، احمد غریب(۳،۱،۸،۹،۱۰)
Prangus ferulacea (جاشیر)	قارون(۱۱،۱۴،۲،۳،۱۲)، دشت زرین(۵،۹،۸)، سپیدان(۱،۵،۳)، فریدن(۲،۵،۳،۱،۷)، کوه ریگ* (۱،۸)، سردشت* (۶،۴)، منگاسه*(۵)
Smyrniopsis aucheri (پیکل)	فلارد(۶،۷،۳)، الیگودرز(۱۹،۱۰،۱)
Kellusia odoratissima (کرفس کوهی)	بازفت(۱۶،۴،۱۸،۱۱،۱۹)
Ferula assa-foetida (آنغوزه)	الیگودرز(۶،۴)

* : نواحی کوه ریگ، سردشت و منگاسه جزو منطقه لردگان محسوب می‌شوند.

جدول۲. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش RAPD-PCR و توالی آنها در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ شاه صدف *Pleurotus eryngii*

نام آغازگر	توالی آغازگر	تعداد لوکوس‌ها	تعداد لوکوس‌های چند شکل	درصد چند شکلی	اندازه باندها (جفت باز)
OPG 05	5´-AGGGGTCTTG- 3´	۱۵	۱۵	۱۰۰	۳۰۰-۲۷۰۰
OPG 07	5´-GAAACGGGTG- 3´	۱۶	۱۶	۱۰۰	۲۵۰-۲۱۰۰
OPG 08	5´-GTGACGTAGG- 3´	۹	۹	۱۰۰	۶۰۰-۱۸۰۰
OPG 10	5´-GTGATCGCAG- 3´	۱۷	۱۷	۱۰۰	۴۲۰-۲۸۰۰
OPG 19	5´-CAAACGTCGG- 3´	۱۷	۱۷	۱۰۰	۳۸۰-۲۵۰۰
OPG 44	5´-GGACTGGAGT- 3´	۲۱	۲۱	۱۰۰	۲۵۰-۳۱۰۰
OPG 47	5´-GGTGACGCAG- 3´	۱۲	۱۲	۱۰۰	۳۱۰-۲۹۰۰
OPG 52	5´-CCTTGACGCA- 3´	۱۵	۱۵	۱۰۰	۲۹۰-۱۳۵۰
OPG 58	5´-CCACAGCAGT- 3´	۱۴	۱۳	۹۲/۸	۳۲۰-۲۱۰۰
OPG 68	5´-GAGGGCGTGA- 3´	۱۴	۱۳	۹۲/۸	۳۸۰-۱۹۵۰
کل		۱۵۰	۱۴۸	۹۸/۶	

۱۰ آغازگر، ۱۸۲ مکان ژنی قابل رویت را مشخص نمودند که در میان آنها، ۱۵۰ مکان ژنی (۸۲٪) چند شکلی خوبی در تمام جدایه‌ها نشان دادند و ۳۲ مکان ژنی دیگر، به‌دلیل بزرگ بودن و یا غیر تکراری بودن حذف شدند. هم‌چنین دو مکان ژنی تک شکلی نشان دادند، که در مطالعات آماری از آنها استفاده نشد (جدول ۲).

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های سرعت رشدرویشی جدایه‌های *Pleurotus eryngii* با روش دانکن

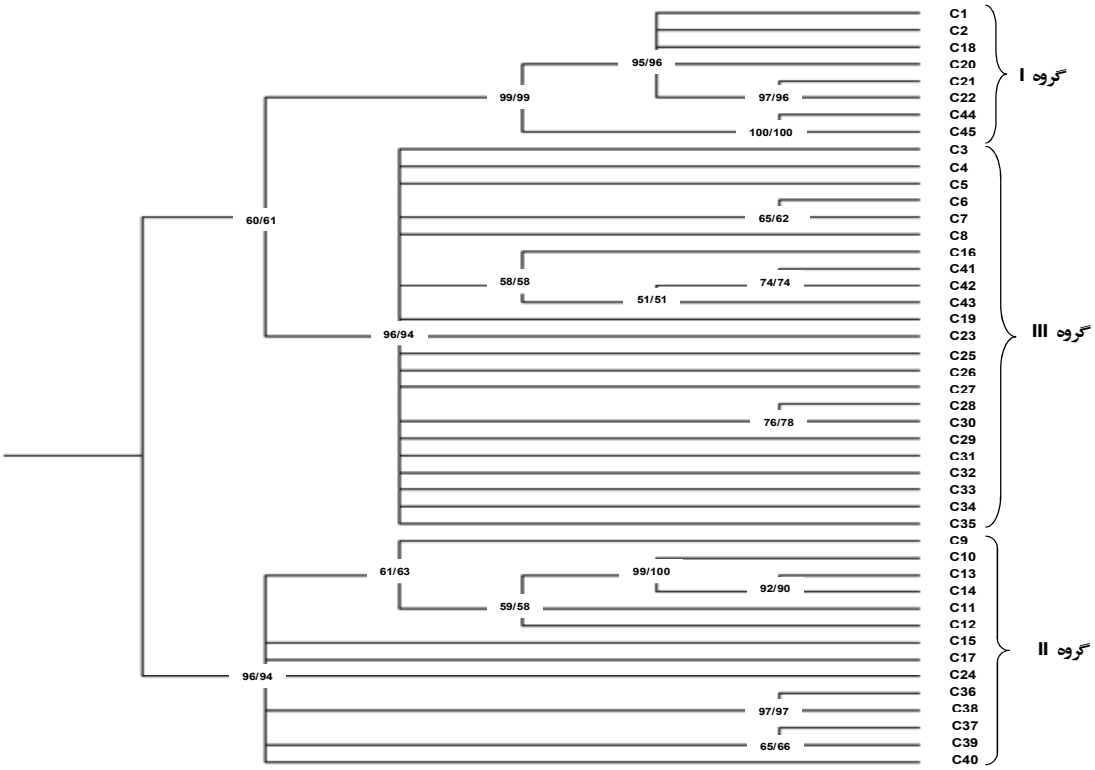
شماره	جدایه	سرعت‌رشد (میلی‌متردرروز)	شماره	جدایه	سرعت رشد (میلی‌متردرروز)
C1	پیر مهران۹	۳/۴۶ f,g	C24	سپیدان۵	۱/۹ k,j,i,n,m,o,l
C2	پیر مهران۲	۴/۶d,e	C25	سپیدان۱	۱/۸k,n,m,o,l
C3	پیر مهران۱۰	۶/۸a,b	C26	فریدن۷	۲/۵۴ g,h,i,j,k,l,m
C4	پیر مهران۵	۱/۳۳ n,o	C27	فریدن۱	۲/۱۳ h,i,j,k,l,m,n
C5	پیر مهران۸	۲/۷۳ g,h,i,j,k,l	C28	فریدن۳	۲/۹g,h,i,j
C6	فلارد۳	۵/۴ c,d	C29	فریدن۵	۱/۷۶ k,n,m,o,l
C7	فلارد۷	۲/۱ h,i,j,k,l,m,n	C30	فریدن۲	۳/۵f,g
C8	فلارد۶	۲/۹۶f,g,h,i	C31	بازفت۱۹	۲/۱۶h,i,j,k,l,m,n
C9	فلارد۱	۱/۶n,m,o	C32	بازفت۱۱	۳/۱۸f,g,h
C10	قارون۱۲	۱/۷ k,n,m,o,l	C33	بازفت۱۸	۲/۵۳ g,h,I,j,k,l,m
C11	قارون۳	۱/۷۶ k,n,m,o,l	C34	بازفت۴	۱/۲۷ n,o
C12	قارون۲	۲/۵۳ g,h,I,j,k,l,m	C35	بازفت۱۶	۱/۷۳ k,n,m,o,l
C13	قارون۱۴	۲k,j,i,n,m,o,l	C36	کوه ریگ۸	۱/۸۳ k,j,n,m,o,l
C14	قارون۱۱	۱/۸۳k,j,n,m,o,l	C37	کوه ریگ۱	۱/۳۶n,o
C15	دشت زرین۸	۱/۹۴ k,j,i,n,m,o,l	C38	سردشت۶	۱/۶۳n,m,o,l
C16	دشت زرین۹	۵/۱ c,d	C39	سردشت۴	۱/۸۳ k,j,n,m,o,l
C17	دشت زرین۵	۰/۹o	C40	منگاسه۵	۱/۶۳n,m,o,l
C18	احمدغریب۱۰	۶/۰۳b,c	C41	الیگودرز۱	۱/۰۹ n,o
C19	احمدغریب۹	۲/۱۱ h,i,j,k,l,m,n	C42	الیگودرز۱۰	۲/۴۸ g,h,i,j,k,l,m
C20	احمدغریب۸	۵/۵۳c,d	C43	الیگودرز۱۹	۲/۹۳g,h,i,j,k
C21	احمدغریب۱	۶/۰۳ b,c	C44	الیگودرز۶	۷/۱۶a
C22	احمدغریب۳	۳/۹۵e,f	C45	الیگودرز۴	۷/۳۶a
C23	سپیدان۳	۲/۷۶ g,h,i,j,k			

نمودار درختی حاصل از گروه‌بندی ۴۵ جدایه قارچ *P. eryngii* به‌وسیله نرم‌افزار NTsys و با استفاده از روش UPGMA، در شکل ۲ نشان داده شده است. آنچه از دندروگرام ترسیم شده قابل تفهیم می‌باشد این است که جدایه‌ها در فاصله ۰/۷۸ به سه گروه عمده تقسیم می‌شوند. تلفیق پرایمرهای انتخاب شده در واکنش‌ها، برای تمیز دادن جدایه‌هایی با میزبانی *Ferula ovina* و *Prangus ferulacea* مناسب بوده است چون آنها به‌صورت مجتمع در گروه‌های اول و سوم یافت می‌شوند ولی جدایه‌های گروه دوم بیشتر بر اساس شباهت‌های اقلیمی دسته‌بندی شده‌اند و لازم است برای جداسازی بهتر آنها بر طبق گیاه میزبان، از تعداد آغازگرهای بیشتری استفاده شود.

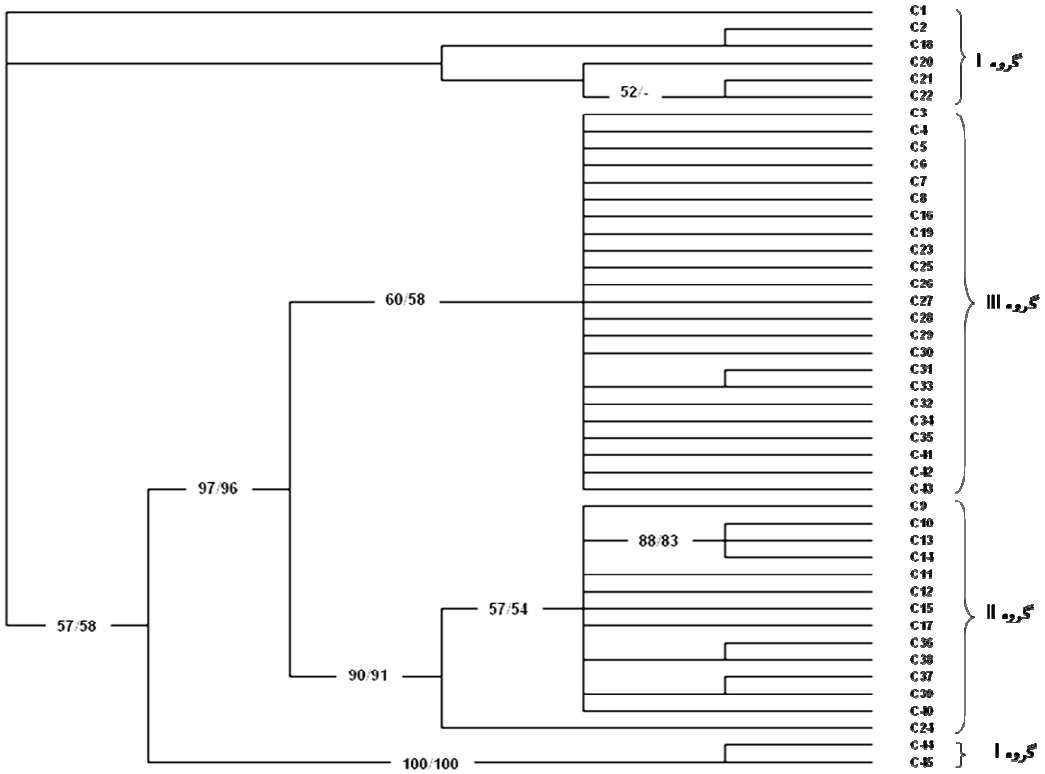
تکنیک‌های بوت استراپ (۳) نیز که از تکنیک‌های نمونه‌برداری مجدد می‌باشد برای دسته‌بندی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت، که البته نتوانست به‌خوبی روش UPGMA گروه‌بندی مناسبی ارائه دهد(شکل ۳). ضریب هم‌بستگی کوفنتیکی ۰/۹۱ و آماره t منتل ۲۶/۹۳ به‌دست آمد،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]



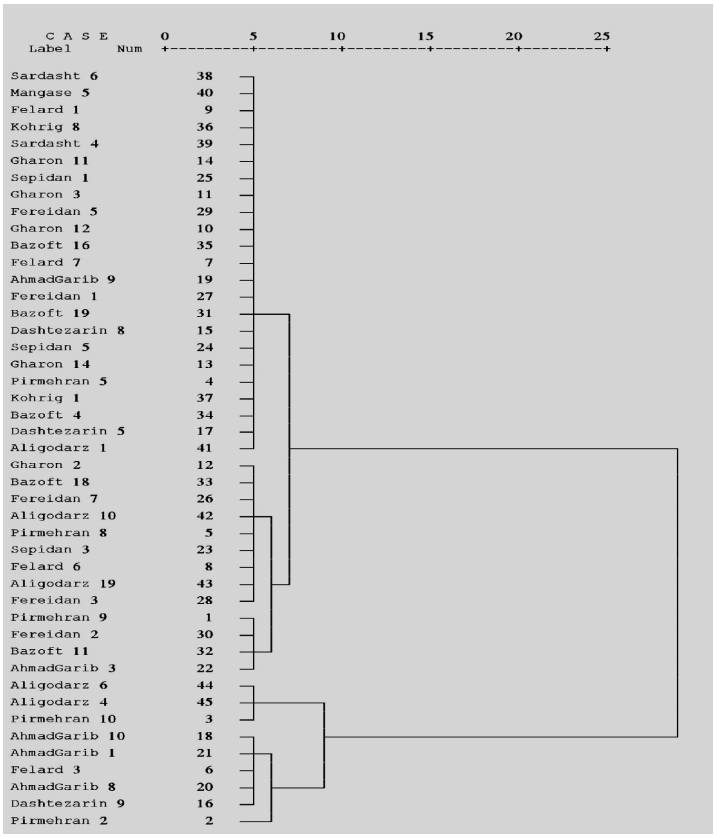
شکل۲. گروه‌بندی جدایه‌های *Pleurotus eryngii* براساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA



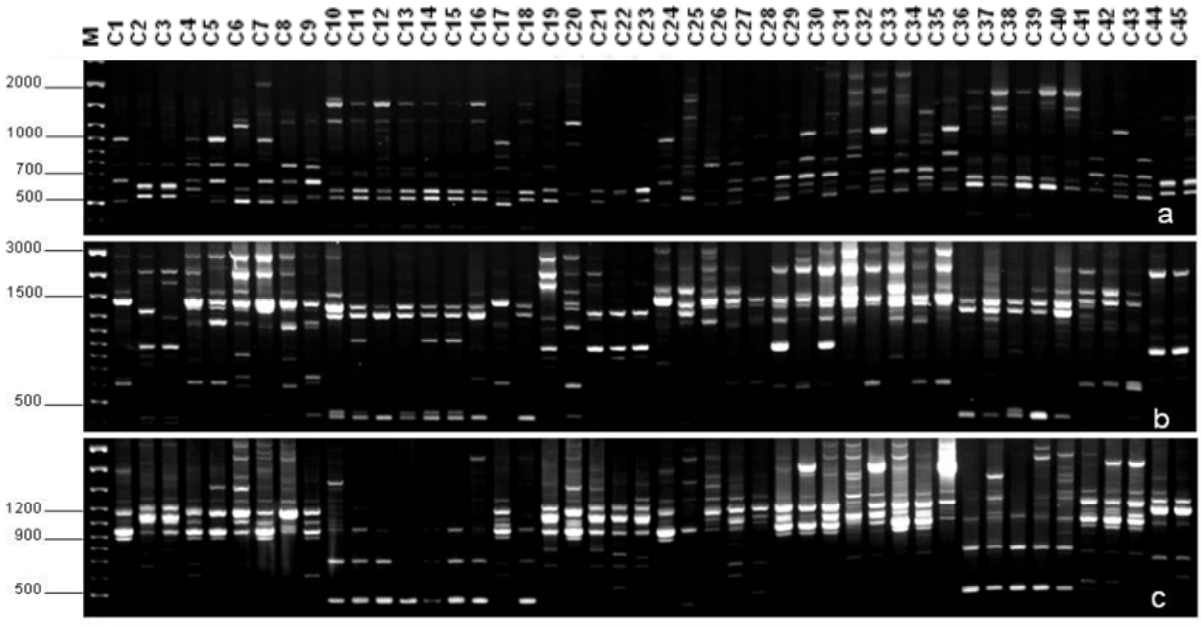
شکل۳. نمودار بوت استراپ برای جدایه‌های Pleurotus eryngii

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]



شکل۴. گروه‌بندی ۴۵ جدایه قارچ شاه صدف بر اساس سرعت رشد با استفاده از نرم افزار SPSS11



شکل۵. الگوی باندی تکثیر شده از DNA جدایه‌های *Pleurotus eryngii* با استفاده ازآغازگرهای OPG68 (a)، OPG44 (b) و OPG10 (c). شماره هر چاهک نشان‌دهنده شماره هر جدایه و حرف M معرف نشانگر اندازه است.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

جدول ۴. آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) برای ۴۵ جدایه *Pleurotus eryngii*

واریانس	درجه آزادی	مجموع مربعات	واریانس اجزاء	درصد واریانس کل
بین جمعیت‌ها	۹	۵۴/۰۷۴	۷/۷۵۶	۲۸/۶۷
داخل جمعیت‌ها	۳۵	۱۹/۲۹۵	۱۹/۲۹۵	۷۱/۳۳
کل	۴۴	۷۳/۳۶۹	۲۷/۰۵۱	

که نشان دهنده برازش خیلی خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی است.

بر اساس تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی، واریانس داخل جمعیت‌ها ۷۱/۳۳ ٪ و واریانس بین جمعیت‌ها ۲۸/۶۷٪ براورد شده است (جدول ۴). در اینجا واریانس درون جمعیت‌ها بیشتر از واریانس بین آنها براورد شده است. همین نتایج از آزمایشات لوینسون و همکاران (۶) و اوربانلی و همکاران (۱۰)، روی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. eryngii*، به‌دست آمده است. این گونه الگوی توزیع تنوع ژنتیکی، نتیجه سطوح بالای جریان ژنی (Gene flow)، به‌وسیله انتشار مؤثر بازیدیوسپورها و بروز ساز و کار دگرلقاحی است. این وقایع باعث محدود شدن خویش‌آمیزی درون جمعیت‌ها و افزایش تنوع در داخل جمعیت‌ها می‌گردد. تاریخچه جمعیت‌ها و سیستم زادآوری *P. eryngii* هم‌چنین هم تکاملی با گیاه میزبان، درجات بالای ناهمگونی در بین جدایه‌ها، ایجاد می‌کند (۱۵). برای تمیز دادن گونه‌ها و واریته‌های جنس *Pleurotus*، می‌توان از روش‌هایی، همچون روش آیزوزایم (۱۰)، و یا از مارکر SSR (۵)، کمک گرفت. توصیه می‌شود از توالی‌یابی قطعه ITS1-5.8S-ITS2 ژن rDNA هسته‌ای، برای دستیابی به اطلاعات جامع تر در خصوص طبقه‌بندی جدایه‌ها، استفاده شود، این روش در مطالعات زرواکیس و همکاران(۱۳)؛ پالپالا و همکاران (۸) و وو و همکاران (۱۲)، برای جداسازی مطلوب جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفته است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد به‌واسطه در اختیار قرار دادن هزینه‌های تحقیقاتی این طرح تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱. صابر، م. ۱۳۶۹. شناسایی قارچ‌های پلئوروتئید شکل از راسته Agaricales در ایران. بیماری‌های گیاهی ایران ۲۶: ۷۳- ۱۱۶.

۲. محمدی گل تپه، ا. و ا. پورجم. ۱۳۸۳. *اصول پرورش قارچ‌های خوراکی*. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

3. Brown, J. K. M. 1994. Bootstrap hypothesis tests for evolutionary trees and other dendro grams. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 12293-12297.
4. Degiola, T., D. Sisto, G. L. Rana and G. Figliulo. 2005. Genetic structure of the *Pleurotus eryngii* species complex. Mycol. Res. 109(1): 71-80.
5. Dellarosa, V., I. Cappuccio, C. Fanelli and S. Urbanelli. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in two basidiomycete species *Pleurotus eryngii* and *P. ferulae*. Mol. Ecol. Notes. 4: 271- 273.
6. Lewinsohn, D., E. Nevo, S. P. Wasser, Y. Hadar and A. Beharav. 2001. Genetic diversity in populations of the *Pleurotus eryngii* complex in Israel. Mycol. Res. 105(8): 941-951.
7. Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.
8. Palpala, V., T. Aimi, S. Inatomi and T. Morinaga. 2002. ITS-PCR-RFLP method for distinguishing commereial cultivars of edible mushroom *Flammulina velutipes*. J. Food Sci. 67(7): 2486-2490.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]

9. Rogers, S. O and A. J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. PP. 1-11. *In*: S. B. Gevin, R. A. Schilperoort and D. P. S. Verma (Eds.), Plant Molecular Biology Manual, Kluwer Academic Pub., USA.
10. Urbanelli, S., V. Dellarosa, C. Fanelli, A. A. Fabbri & M. Reverberi. 2003. Genetic diversity and population structure of the Itlian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC. : Fr.) Quel and *P. ferulae* (DC. : Fr.) Quel. Heredity 90: 253-259.
11. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tinger 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Res: 18: 6531-6535.
12. Wu, Q. X., G. M. Muller, F. M. Lutzoni, Y. Q. Huang and S. Y. Guo. 2000. Phylogenetic and biogeographic relationship of eastern Asian and eastern North American disjunct *Suillus* species (Fungi) as inferred from nuclear ribosomal RNA ITS sequences. Mol. Phylo. Evol. 17: 37-47.
13. Zervakis, G., J. M. Moncalvo and R. Vilgalys. 2004. Molecular phylogeny, biogeography and speciation of mushroom species *Pleurotus cystidiosus* and allied taxa. Microbiology 150: 715- 726.
14. Zervakis, G., G. Venturella and K. Papadopoulou. 2001. Genetic polymorphism and taxonomic infrastructure of the *Pleurotus eryngii* species, complex as determind by RAPD analysis, isozyme profiles and ecomorphological characters. Microbiology 147: 3183-3194.
15. Zervakis, G., J. Sourdis and C. Balis. 1994. Genetic variability and systematics of eleven *Pleurotus* species based on isozyme analysis. Mycol Res. 98: 329-341.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1388.13.47.59.7]