



غربالگری هموکاریونها و تولیدنژاد دورگ جدید قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره

سیده مرضیه نوراشرف الدین¹ - محمد فارسی^{2*} - فرج اله شهریاری³ - جواد جانپور⁴

تاریخ دریافت: 1396/03/01

تاریخ پذیرش: 1396/05/01

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) رایج‌ترین قارچ خوراکی در ایران و دنیا است، اما به‌دلایلی از جمله استفاده از نژادهای کم محصول و پسروی نژادی، عملکرد این قارچ در کشور کمتر از متوسط عملکرد آن در دنیا می‌باشد. یکی از برنامه‌های به نژادی، تولید نژاد F1 حاصل از آمیزش هموکاریونها است که مستلزم در اختیار داشتن جدایه‌های هموکاریون می‌باشد. در این مطالعه ابتدا 160 جدایه تک‌اسپور کند رشد از نژاد A15 جداسازی شد و سپس براساس ویژگی‌های مورفولوژیک، از بین آنها 18 نمونه بررسی و انتخاب شدند. در مرحله‌ی بعد، از نشانگر هم‌بارز ریزماهواره (SSR) جهت شناسایی هموکاریونها استفاده شد. ده آغازگر که در نمونه‌های شاهد مادری دارای چندشکلی بودند برای نمونه‌های مورد آزمایش نیز استفاده شدند. جدایه‌ها براساس حضور و عدم حضور باندهای چندشکل در دو گروه کلی هتروآلیلیک و هموآلیلیک قرار گرفتند و هفت جدایه که در تمامی جایگاه‌های بررسی شده الگوی باندی تک باند نشان دادند به عنوان جدایه‌ی هموکاریون در نظر گرفته شدند. به منظور محاسبه سطح تنوع ژنتیکی بین 7 جدایه هموکاریون به دست آمده، ماتریس فاصله ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc محاسبه شد و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 0/17 تا 0/67 متغیر بود. در مرحله‌ی بعد نمونه‌های شماره 4 و 8 با بیشترین فاصله ژنتیکی نسبت به سایر نمونه‌ها جهت تشکیل هیبرید در تلاقی شرکت داده شدند. نتیجه این تلاقی، تولید هیبرید N1 بود که با افزایش ناگهانی در رشد و تولید میسلیم هوایی در محل الحاق همراه بود که در مقایسه با والد‌های هموکاریون، سرعت رشد بیشتری داشت. در ادامه، جهت تأیید مولکولی هیبرید حاصل، واکنش PCR-SSR با استفاده از یک پرایمر (AbSSR 45) انجام گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت در هیبرید N1 همانند نمونه‌ی شاهد هتروکاریون، دو باند قابل امتیازدهی حاصل شد که نشان‌دهنده‌ی وجود دو هسته‌ی غیرخواه‌ری در هر واحد سلولی آن می‌باشد. نتایج نشان دادند که با استفاده از نشانگر SSR می‌توان با احتمالی بیش از 99/8 درصد نسبت به قطعیت هموکاریونی پس از اجرای آزمایش با 10 آغازگر دست یافت و به این ترتیب از آنها در برنامه‌های اصلاحی جهت تولید هیبرید بهره برد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنتیکی، تنوع مورفولوژیک، نشانگر هم‌بارز، هتروکاریون

مقدمه

شده است، اما عملکرد این قارچ در کشور کمتر از متوسط عملکرد آندر دنیا می‌باشد (10). یکی از دلایل مهم این کاهش عملکرد، استفاده از نژادهای کم محصول و پسروی نژادی می‌باشد (11، 18 و 51). یکی از راه‌های غلبه بر این مشکل تداوم برنامه‌هایی نژادی به منظور حفظ و بهبود نژادهای مادری و تولید نژادهای جدید می‌باشد (10 و 11). از جمله این برنامه‌ها، تولید نژاد F1 حاصل از آمیزش هموکاریونها است که مزایای زیادی دارد و یکی از مهم‌ترین روش‌های اصلاحی قارچ *Agaricus bisporus* است (56 و 11). جداسازی میسلیم‌های هموکاریون و تشخیص و تأیید تلاقی‌های موفق بین هموکاریونها یک پیش‌شرط ضروری برای تولید یک نژاد هیبرید برتر به حساب می‌آید، اما

از میان قارچ‌های خوراکی، قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricusbisporus*) رایج‌ترین قارچ خوراکی در ایران و دنیا است که در سال‌های اخیر به دلیل ارزش غذایی و دارویی زیادی که دارد (45، 48، 11، 22، 32 و 48) توجه زیادی به تولید و پرورش آن معطوف

1، 2 و 3 - به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(* - نویسنده مسئول: Email: Farsi@um.ac.ir)

4 - عضو هیأت علمی گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

اسپور بر میلی لیتر تنظیم و 300 میکرولیتر از آن، به ظرف پتری محتوی محیط کشت⁶ PDA منتقل شد. برای به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی از جنتامایسین با غلظت 40 میکروگرم بر میلی لیتر استفاده شد. ظروف به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت 24 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت سه تا چهار روز از زمان کشت اسپورها، بررسی روزانه وضعیت رشد اسپورها به صورت چشمی در زیر نور مهتابی و یا با استفاده از میکروسکوپ، انجام گرفت. تک-اسپورهایی که رشد سریعی داشتند حذف شدند و تک اسپورهایی که رشدی به ظروف پتری جدید حاوی محیط کشت عصاره کمپوست - آگار⁷ (CE/A) انتقال و در دمای 24 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این کشت را به نام کشت تک اسپور اولیه در نظر گرفتیم (10 و 21). قطر پرگنه هر یک از ایزوله‌های تک اسپور مورد مطالعه به مدت یک ماه و به فواصل یک هفته‌ای به طور منظم در محیط CE/CYM اندازه‌گیری شد (شکل 2). نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای 24 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. یک هفته پس از کشت، اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌های تک اسپوری شروع شد و در نهایت پرگنه‌ها در سه کلاس تند رشد، رشد میانه و کند رشد طبقه بندی گردیدند.

مسیلوم تک اسپورهای جداسازی شده در محیط کشت مایع CE به مدت 25 روز کشت شد. استخراج DNA با روش CTAB همراه با تغییرات اندکی انجام شد (7، 9 و 52). مقدار و کیفیت DNA ژنومی توسط الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد. در این پژوهش 10 آغازگر ذکر شده در جدول 1 (12) استفاده گردید و واکنش PCR در حجم 20 میکرولیتر برای تک اسپورهای جداسازی شده و نمونه مادری (شاهد هتروکاریون) انجام شد. چرخه حرارتی و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR شامل سه دقیقه واسرشت سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی گراد، 34 چرخه شامل 30 ثانیه واسرشت سازی در دمای 94 درجه سانتی گراد، اتصال آغازگر به مدت 30 ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر آغازگر (52-58) درجه سانتی گراد (جدول 1) و 30 ثانیه گسترش در دمای 72 درجه سانتی گراد و گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتی گراد بود. برای بررسی نتایج آزمون PCR نینیزل آغازگر دو درصد تهیه شد (12). براساس مکان‌های تکثیر شده توسط هر جفت آغازگر، حضور باند با "1" و عدم حضور باند با "0" امتیازدهی شد. داده‌ها پس از ورود به محیط Excel جهت تجزیه و تحلیل به نرم افزار NTSYSpc (2.02 e) منتقل شدند و از روش UPGMA برای آنالیز فاصله ژنتیکی استفاده گردید. در نهایت ماتریس شباهت ژنتیکی با استفاده از ضریب تعیین جاکارد محاسبه شد. با استفاده از نتایج ماتریس شباهت ژنتیکی، جدایه‌های هموکاریون دور از هم جهت بدست آوردن هیبرید بهتر، انتخاب و با یکدیگر

با توجه به اینکه چرخه‌ی زندگی قارچ دکمه‌ای از نوع هموتالیک ثانویه است، استفاده از روش‌های سنتی مانند تفاوت‌های مورفولوژیکی و آیزوایمی به دلیل تأثیرپذیری از محیط، برای انجام این کار کارایی لازم را ندارند (19، 27، 31، 43، 46). بنابراین در دوره‌ی اخیر برای مطالعات ژنتیکی و جداسازی هموکاریون‌ها در قارچ‌های خوراکی از نشانگرهای مولکولی مانند¹RFLP (5)،²RAPD (21، 35، 53 و 58) ITS (29)،³AFLP (2، 16، 30، 55)،⁴ISSR (38، 39 و 40) و⁵SSR استفاده شده است (3، 5، 12، 13، 24 و 28).

از بین نشانگرهای مولکولی فوق، استفاده از نشانگر هم بارز SSR جهت جداسازی هموکاریون‌ها موفقیت آمیزتر بوده و کار با آن نیز ساده‌تر است (49، 57، 59 و 60). بیارتی و همکاران (3) نشان دادند که استفاده از این نشانگر در مقایسه با روش‌های مورفولوژیکی از اطمینان بیشتری برخوردار است و همچنین کارایی خوبی در جداسازی هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها در قارچ دکمه‌ای *A. bisporus* دارد. همچنین فولگن و همکاران (12) 33 نشانگر SSR را از DNA قارچ *A. bisporus* شناسایی کردند و پس از استفاده جهت شناسایی نژاد تجاری و بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای در این قارچ، این نشانگر را جهت آنالیز ژنتیکی قارچ دکمه‌ای، مناسب و کارآمد دانستند.

تولید نژادهای جدید و پرمحصول یکی از اولویتهای اصلی برنامه‌های اصلاحی قارچ خوراکی است. با اینکه در سال‌های گذشته سه نژاد هیبرید در کشور تولید شده است (10 و 15)، اما همچنان نیاز به نژادهای پرمحصول جهت افزایش تولید و میزان سودآوری واحدهای تولید قارچ احساس می‌شود. در این پژوهش با استفاده از نشانگر SSR جدایه‌های هموکاریون قارچ *A. bisporus* جداسازی شده و به منظور تولید بذر هیبرید با یکدیگر تلاقی داده شدند و یک نژاد تجاری جدید تولید گردید.

مواد و روش‌ها

کلاهیک مادری قارچ دکمه‌ای سفید، نژاد A15 از مرکز زیست-فن‌آوری قارچ‌های خوراکی جهاد دانشگاهی مشهد تهیه گردید. یک عدد قارچ رسیده و تمیز که پرده‌ی زیر کلاهیک آنها بسیار کشیده و نازک شده بود، انتخاب و قسمت پایه و پرده زیر کلاهیک حذف گردیدند. کلاهیک روی کاغذ صافی سترون، در یک پتری قرار گرفته و با یک بشر سترونپوشانده شد. بعد از گذشت 72 ساعت اسپورها به روی کاغذ صافی منتقل شدند. یک مایع تعلیقی غلیظ از اسپورها تهیه و با استفاده از یک لام گلبول شمار، غلظت اسپورها بر روی 15000

- 1- Restriction Fragment Length Polymorphism
- 2- Random Amplification of Polymorphic DNA
- 3- Amplified fragment of Length Polymorphism
- 4- Inter Simple Sequence Repeat
- 5- Simple Sequence Repeat

6- Potato Dextrose Agar

7-Compost Extract Agar

تلاقی داده شدند. این عمل با قرار دادن جدایه‌های تک اسپور در کنار یکدیگر در داخل یک محیط کشت صورت گرفت. میسلیم‌ها در محل تلاقی رشد دو میسلیم، تشکیل هیبرید داده و هیبریداسیون با کمک نشانگر SSR تایید گردید (شکل 6- الف).

جدول 1- لیست آغازگرهای SSR مورد استفاده

آغازگر Primer	توالی نوکلئوتیدی Sequence (5→3)	دمای اتصال Annealing temperature (° C)
AbSSR 23	F*- TTTGGGATGTGACCAGACTT R-AACGTTGGTTCATGAAAA	52
AbSSR45	F-CACCTTACACGGCCATTGAT R-AAAACCTTCGGCATTTCCTT	52
AbSSR65	F-ACCTCAACGATTCCAACGAC R-TCCATAAACACCCCTTCTCG	52
AbSSR09	F-ACAAGAAGGGGAGGATTGAG R-ATAGTCGCGTAACCCCTCTT	57
AbSSR06	F-ACCACATTCTGGAAAACGAA R-TTAATGCTCTTGCTTCGAC	58
AbSSR63	F-CTGGATATGGGGAGATGTGG R-ATTGGACCAGCCAAAGACAC	56
AbSSR62	F-GTTGGTCACGAACTCATGCT R-CCCAATCACCTCCTTGTGT	52
AbSSR58	F-ATGTCGAGGAGGAGGAGGAT R-AGGGAGAGGGAGAGGGATTT	52
AbSSR04	F-ACAACAACCGCCACCACCAT R-CAGGCGTATATCGCTGTTGCTG	58
AbSSR36	F-CGTTGATGGAGTTGACTGAG R-ACAACAAAATCGTCGTGAGG	55

F= Forward primer, R= Reverse primer*

نتایج و بحث

تندش بازیدیوسپورها: در این پژوهش از تک اسپورها به عنوان منبع جداسازی هموکاریون‌ها استفاده شد زیرا بر اساس پژوهش‌های گذشته تک اسپورها یک منبع مناسب برای این کار محسوب می‌شوند (22، 23، 24، 25 و 26). پس از گذشت ده روز از کشت اسپورها در محیط کشت PDA، تندش بازیدیوسپورها آغاز شد و با مشاهدات میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی 10 برابر عدسی شیئی)، قابل مشاهده بود (شکل 1). تا دو هفته پس از کشت اسپور، بررسی و جدا کردن تک‌اسپورها ادامه یافت و در نهایت 160 جدایه تک‌اسپور کند رشد از نژاد A15 به دست آمد.

در فرآیند کشت اسپورهای قارچ دکمه‌ای سفید، معمولاً اسپورهای هتروکاریون‌ها زودتر جوانه می‌زنند و با توجه به اینکه نرخ رشد کلونی با زمان جوانه‌زنی مرتبط است (60) می‌توان گفت کلونی‌هایی که زودتر رشد می‌کنند به احتمال زیاد هتروکاریون هستند. در نتیجه در این آزمایش برای افزایش احتمال گزینش هموکاریون‌ها، بازیدیوسپورهایی که سریعتر جوانه زدند، را حذف کرده و 160 بازیدیوسپور کند رشد برای انتقال به محیط کشت CE/CYM انتخاب شدند و یک ماه پس از انتقال تک‌اسپورها (پرگنه‌های منفرد)، شبکه

میسلیمی هر تک‌اسپور به قدر کافی سطح محیط کشت را فرا گرفت. نرخ رشد کم هموکاریون‌ها می‌تواند یک معیار استاندارد برای تمایز آنها از هتروکاریون‌ها باشد. تفاوت رشد بین هموکاریون‌ها و هتروکاریون‌ها می‌تواند منشأ ژنتیکی داشته باشد و تحت تأثیر ژنوم هسته و میتوکندری است (8 و 24). ژو و همکاران (60) نشان دادند که نرخ رشد در هموکاریون‌ها با یک نشانگر بر روی کروموزوم شماره 3 قارچ *A. bisporus* مرتبط است. همچنین بستاید و همکاران (8) نیز گزارش کردند که ژنوم میتوکندری می‌تواند نرخ رشد در این قارچ را تحت تأثیر قرار دهد.

تنوع در میان جدایه‌های خالص: از بین 160 جدایه مورد بررسی، 53 جدایه در کلاس خیلی کند، کند رشد و رشد میانه و بقیه در کلاس رشدی سریع قرار گرفتند (جدول 2). جدایه‌هایی که در کلاس رشدی سریع قرار داشتند و همچنین جدایه‌های متعلق به کلاس سرعت رشد میانه که تیپ رشدی رشته‌ای از خود نشان دادند (احتمالاً هتروکاریون) حذف شدند. در نهایت بر اساس سرعت رشد، تعداد 18 جدایه که تقریباً 11 درصد کل جدایه‌ها را تشکیل می‌دادند به عنوان هموکاریون احتمالی شناخته شدند. به طور معمول فراوانی هموکاریون‌ها کمتر از هتروکاریون‌ها می‌باشد، به طوری که کریگن و همکاران (23) نیز گزارش کردند که حدود 10 درصد تک اسپورهای قارچ *A.*

bisporus رامیسلیوم هموکاریون تشکیل داده است.



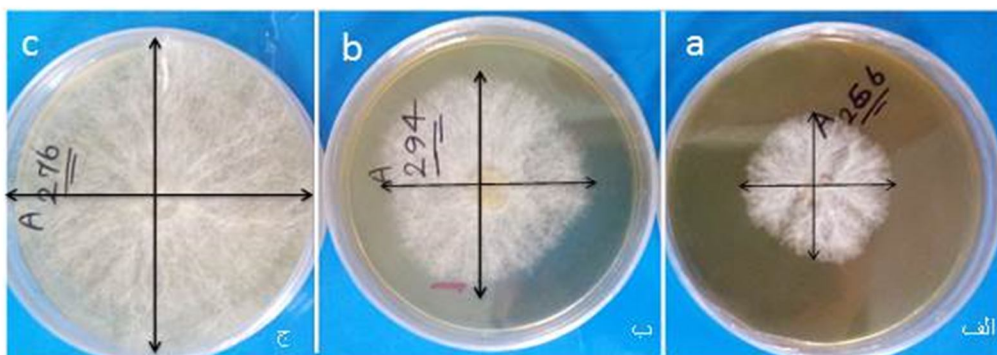
شکل 1- تک اسپور قارچ دکمه‌ای سفید در مراحل اولیه رشد (100×)

Figure 1- A single spore of the white button mushroom in early stages growth (100×)

هفته، پرگنه میسلیوم قارچ دکمه‌ای سطح محیط کشت اکثر شیشه‌ها را پر کرد و نمونه‌ها آماده برداشت جهت استخراج DNA بودند. در نمونه‌هایی که بیش از چهار هفته از کشت آنها می‌گذشت رنگ میسلیوم قهوه‌ای می‌شد، که این قهوه‌ای شدن می‌تواند تحت تاثیر مواد فنولیکی تولیدشده توسط میسلیوم یا فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده رنگ از جمله پلی‌فنل اکسیداز باشد (20) که فعالیت آنها به تغییر pH محیط کشت در طول زمان رشد میسلیوم حساس می‌باشد (36). برای رفع این مشکل، میسلیوم جدایه‌ها حداکثر ظرف مدت سه هفته برای استخراج استفاده شدند.

در بررسی‌های مورفولوژیکی انجام شده بر روی میسلیوم‌های مورد بررسی، انواع مختلفی از تیپ رشدی از جمله تیپ‌های رشدی رشته-ای، پنبه‌ای و نمدی میسلیوم مشاهده شد (شکل 3). به طور مشابهی در آزمایشات دیگر محققان، شکل میکروسکوپی میسلیوم و برخی از شاخص‌های مورفولوژیکی در بین جدایه‌های خالص متفاوت بود (10 و 11). این تفاوت نشان از رشد غیرمعمول میسلیوم نسبت به حالت جارویی می‌باشد (17).

کشت مایع میسلیومی، استخراج DNA و بررسی کیفیت آن: جهت استخراج DNA ژنومی، کشت مایع میسلیومی 18 تک اسپور انتخاب شده از مرحله قبل انجام گرفت. پس از گذشت چهار



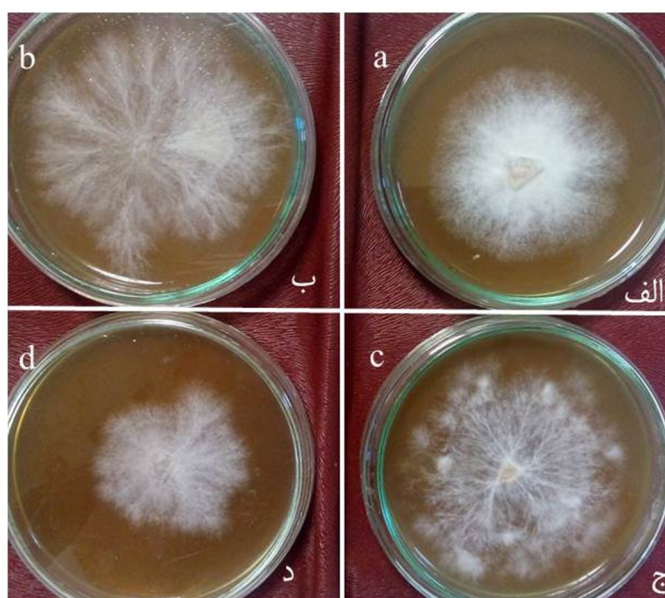
شکل 2- تنوع سرعت رشد پرگنه جدایه‌های تک اسپور قارچ دکمه‌ای سفید دو هفته پس از کشت. الف) جدایه کند رشد ب) جدایه دارای رشد متوسط ج) جدایه دارای رشد سریع

Figure 2-Variation in growth rate of single spore isolates of the white button mushroom two weeks after the cultivation. a) Slow growing strain, b) Medium growing strain c) Fast growing strain

جدول 2- تعیین سرعت رشد جدایه های تک اسپوردر *A. bisporus*

Table 2- Determining the growth rate of single spore isolates of the *A. bisporus*

میانگین سرعت رشد در هفته	نوع کلاس	تعداد جدایه ها	فراوانی نسبی ایزوله ها
The average growth rate for the week	The type of class	The number of isolates	The relative frequency of isolates
کمتر از 3 میلی متر Less than 3mm	خیلی کند رشد slow growth Very	5	3.12
مساوی 3 و کمتر از 6 میلی متر 3 to 6 mm	کند رشد Slow growth	15	9.37
مساوی 6 و کمتر از 9 میلی متر 6 to 9 mm	رشد میانه Moderate growth	33	20.62
بیشتر از 9 میلی متر Higher than 9 mm	رشد سریع Fast growth	107	66.87
جمع کل Total		160	100



شکل 3- تنوع جدایه های *A. bisporus* از لحاظ تیپ رشدی پرگنه. الف) رشد پنبه ای

ب) رشد رشته ای (ج) رشد رشته ای و در انتهای میسلیم به صورت پنبه ای (د) رشد نمدی

Figure 3-Variation of *A. bisporus* isolates in terms of colony growth type, a) Apprised, b) Strandy, c) Strandy and at the end apprised, d) Appressed concentric ring

استفاده شده در والد هتروکاریون که به عنوان شاهد، در نظر گرفته شده بود دارای دو باند قابل امتیازدهی می باشند. در سایر نمونه های مورد مطالعه، برخی نمونه ها الگوی بانندی شبیه والد هتروکاریون خود-حضور دو باند - و برخی دیگر تنها یکی از دو باند والدی را دارا بودند که با نتایج بدست آمده از پژوهش های دیگر همخوانی دارد (3، 37 و 50). شکل (4) الگوی بانندی آغازگر AbSSR45 حاصل از جدایه ها را نشان می دهد. طبق نقشه ی ژنتیکی ارائه شده توسط فوتولونگ و همکاران (13)، هر یک از نشانگرهای SSR استفاده شده در این آزمایش، تنها دارای یک جایگاه در سراسر ژنوم *A. bisporus* می باشد، در نتیجه انتظار می رود به ازای هر نوع هسته در واحد سلولی

این تغییر کوچک، کیفیت DNA بدست آمده را تا حد زیادی افزایش داد. راندمان استحصال DNA از جدایه های کند رشد انتخاب شده جهت استخراج DNA در مقایسه با نمونه ی هتروکاریون انتخاب شده به عنوان شاهد بسیار پایین بود که با توجه به سرعت رشد پایین نمونه های هموکاریون قابل توجهی می باشد، بنابراین توصیه می شود در مطالعات بعدی از چند تکرار کشت مایع برای هر نمونه استفاده شود تا حجم میسلیم افزایش پیدا کند و DNA مورد نیاز به مقدار کافی به دست آید.

تغییرات الگوی بانندی در میان 18 جدایه ی تک اسپور: با مشاهده ی نتایج حاصل از ژل آگارز، مشخص شد که هر یک از آغازگرهای

هموکاریون‌ها را می‌توان از هتروکاریون‌ها تمایز داد. نتایج فوق تأییدی بر قابلیت مناسب نشانگر SSR در تشخیص هموکاریون‌ها از هتروکاریون‌ها می‌باشد.

میسلیم، یک باند قابل امتیازدهی حاصل شود به طریقی که در نتایج هتروکاریون با دارا بودن دو هسته‌ی متفاوت، دو باند و در نتایج هموکاریون که دارای هسته‌های یکسان می‌باشند، یک باند قابل امتیازدهی حاصل شود. با توجه به همباز بودن این نشانگر،



شکل 4- الگوی بانندی ایجاد شده توسط آغازگر AbSSR 45 بر روی ژل آگارز: m: سایزمارکر 100bp plus، 1: شاهد هتروکاریون، 2-19: جدایه‌های تک‌اسپور

Figure 4 – Banding patterns generated by AbSSR45 primer on agarose gel, m: DNA ladder 100bp plus, 1: Heterokaryons control, 2-19: Single-spore isolates

هموزیگوس بودند.

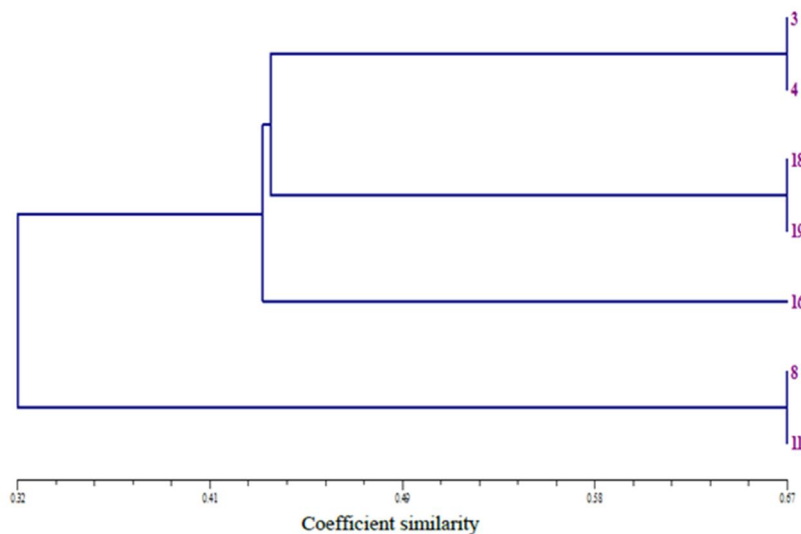
گروه‌بندی جدایه‌های هموکاریون بر اساس فاصله ژنتیکی:
هفت هموکاریون از نژاد A15 قارچ دکمه‌ای سفید مورد بررسی بدست آمد. به منظور محاسبه فاصله ژنتیکی بین هریک از این جدایه‌ها از ماتریس فاصله ژنتیکی استفاده شد و دندروگرام ترسیم گردید. بر اساس داده‌های SSR، تشابه ژنتیکی جفت نمونه‌ها بین 17/ تا 67/ متغیر بود شکل (5) و جدول (4).

تأیید مورفولوژیکی و مولکولی دورگ حاصل: با توجه به نتایج حاصل از ماتریس شباهت ژنتیکی و این موضوع که دو هموکاریون، هرچه از شباهت کمتری با یکدیگر برخوردار باشند امکان رسیدن به یک هیبرید برتر بیشتر خواهد بود (10 و 11)، دو نمونه با شماره‌های 4 و 8 با کمترین میزان تشابه ژنتیکی نسبت به سایر نمونه‌ها (17/)، جهت تشکیل هیبرید در تلاقی شرکت داده شدند. نتیجه این تلاقی تولید هیبرید N1 می‌باشد که با افزایش ناگهانی در رشد و تولید میسلیم هوایی در محل الحاق همراه بود (شکل 6 -الف)، هیبرید N1 به عنوان یک نژاد جدید معرفی می‌شود که در مطالعات آینده از نظر عملکرد می‌تواند با نژادهای تجاری موجود قابل مقایسه باشد.

همانطور که انتظار می‌رفت از هریک از نشانگرها، دو باند قابل امتیازدهی در والد هتروکاریون مادری که به عنوان شاهد در نظر گرفته شده بود، حاصل شد که نشان‌دهنده وجود دو هسته‌ی غیرخواه‌ری در هر واحد سلولی آن می‌باشد (12). به منظور تفسیر باندهای حاصله از هر آغازگر، در صورت حضور باند "1" و عدم حضور باند "0" در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج خلاصه شده نشانگر SSR موجود در جدول (3)، از 18 جدایه بدست آمده، 11 جدایه‌ای که دارای حداقل یک جایگاه هتروزیگوس بودند - داشتن هر دو باند مشاهده شده در والد مادری - به عنوان جدایه‌های هتروآلیلیک و هفت جدایه‌ای که در تمام مکان‌های ژنی بررسی شده کاملاً هموزیگوس بودند - دارای تنها یکی از باندهای مشاهده شده در والد مادری - به عنوان جدایه‌های هموآلیلیک دسته‌بندی شدند. از یازده جدایه هتروآلیلیک، هشت جدایه در تمام مکان‌های ژنی الگوی بانندی مشابه والد هتروکاریون خود نشان دادند و هیچ‌گونه تنوع آلی در آن‌ها مشاهده نشد (دارای 10 جایگاه هتروزیگوس) و یک جدایه در تمامی مکان‌های ژنی به جزء یک جایگاه، الگوی بانندی شبیه والد هتروآلیلیک خود نشان داد (دارای نه جایگاه هتروزیگوس و یک جایگاه هموزیگوس) و دو جدایه دارای تعداد متفاوت جایگاه هتروزیگوس و

جدول 3- نتایج خلاصه شده ارزیابی باندهای حاصل از نشانگرهای SSR
 Table 3- Summary results Evaluation of bands obtained from SSR markers.

تعداد جایگاه هموزیگوس	تعداد جایگاه هتروزیگوس	جدایه های A15
No. homo locus	No. hetero locus	A15 isolates
0	10	1=control
0	10	2
10	0	3
10	0	4
0	10	5
7	3	6
0	10	7
10	0	8
4	6	9
0	10	10
10	0	11
1	9	12
0	10	13
0	10	14
0	10	15
10	0	16
0	10	17
10	0	18
10	0	19



شکل 5- دندروگرام ترسیم شده با روش UPGMA برای 7 جدایه هموکاریون *A. bisporus* با استفاده از نشانگرهای SSR
 Figure 5- UPGMA dendrogram presentation for SSR markers differentiation of 7 homokaryon isolates of *A. bisporus*

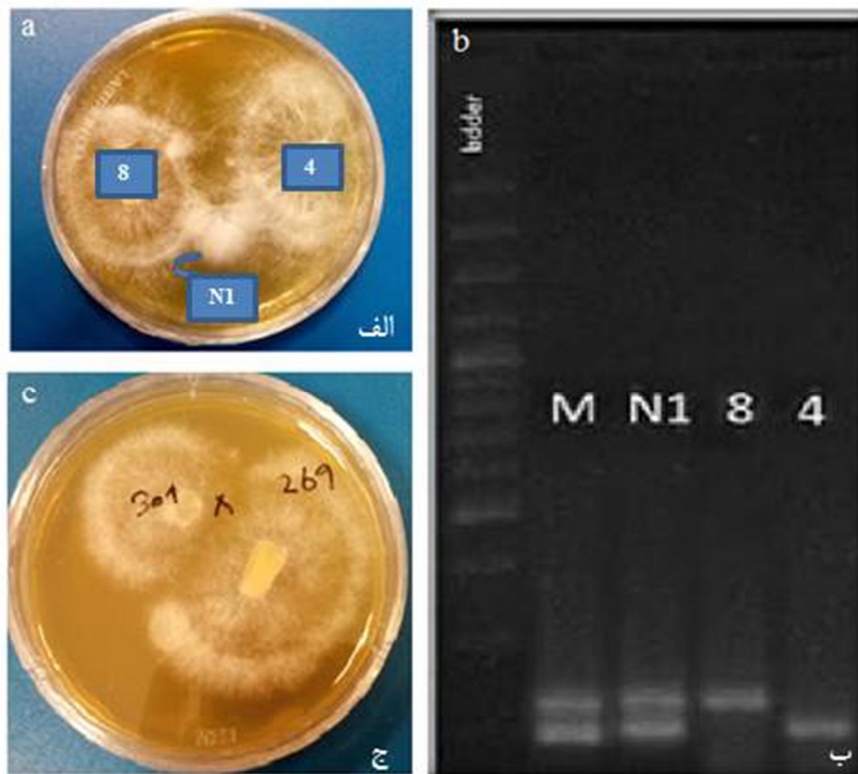
جدول 4- ماتریس شباهت ژنتیکی برای 7 جدایه هموکاریون *A. bisporus* بر اساس داده های SSR
 Table 4- The genetic similarity matrix 7 homokaryon isolates (*A. bisporus*) based on SSR data

	3	4	8	11	16	18	19
3	1						
4	0.6	1					
8	0.3	0.17	1				
11	0.5	0.3	0.6	1			
16	0.4	0.4	0.3	0.3	1		
18	0.3	0.5	0.2	0.2	0.5	1	
19	0.3	0.5	0.2	0.4	0.3	0.6	1

میسلیوم آن از هموکاریون‌های مادری به راحتی امکان پذیر بود و از محل الحاق میسلیوم‌ها واکنش تهیه گردید و با والدین از نظر رشد رویشی مقایسه شد که مشاهدات نشان داد که هیبرید N1 در محیط کشت CE دارای رشد رویشی مناسب و سرعت رشد بیشتری در مقایسه با دو والد هموکاریون است که می‌تواند تأییدی بر هتروکاریون بودن آن باشد. در ادامه، جهت تأیید مولکولی هیبرید حاصل، واکنش PCR-SSR با استفاده از یک پرایمر (AbSSR 45) انجام گرفت. همانطور که انتظار می‌رفت در هیبرید N1 همانند نمونه شاهد هتروکاریون، دو باند قابل امتیازدهی حاصل شد که نشان‌دهنده وجود دو هسته غیرخواه‌ری در هر واحد سلولی آن می‌باشد (شکل 6-ب).

تلاقی دو هموکاریون نشان‌دهنده این است که این دو میسلیوم دارای تیپ آمیزشی متفاوتی هستند در غیر این صورت امکان تلاقی بین این دو وجود ندارد (41، 34، 33، 4 و 45) پس می‌توان این گونه بیان کرد که نیاز است در مطالعات آینده به جز مطالعات ماتریس شباهت ژنتیکی بین دو هموکاریون، تفاوت یا شباهت تیپ آمیزشی آن دو نیز مورد بررسی قرار گیرد زیرا همانطور که در شکل (6-ج) مشاهده می‌شود تلاقی بعضی از هموکاریون‌های مورد بررسی (که به‌جدا از آزمایش اصلی صورت گرفت) به دلیل شباهت تیپ آمیزشی امکان نداشت.

در مرحله بعد، با توجه به مشخص بودن محل تلاقی و تفاوت واضح سرعت رشد میسلیوم هیبرید N1 در محل الحاق، جداسازی



شکل 6-الف) کشت همزمان و مجاور هم دو هموکاریون با بیشترین فاصله ژنتیکی (4 و 8) در یک پتری جهت تلاقی و گرفتن هیبرید. N1: هیبرید حاصل از تلاقی دو هموکاریون (8 \times 4 *A. bisporus*). ب) الگوی بانندی ایجاد شده توسط آغازگر AbSSR 45 بر روی ژل آگارز، ladder: سایزمارکر 100bp plus، M: شاهد هتروکاریون، N1: هیبرید، 4 و 8 نمونه‌های هموکاریون والدی، ج) دو نمونه‌ی ناسازگار تیپ آمیزشی

Figure 6-a) Concurrent culture two homokaryons of *A. bisporus* with the highest genetic distance (4 and 8) in a petri to cross and obtaining the hybrid. N1: Hybrid resulting from a cross between two homokaryon (4 \times 8). b) Banding patterns were generated by AbSSR45 primer on agarose gel, ladder: DNA ladder 100bp plus, M: Heterokaryon control, N1: Hybrid, 4, 8: Parental homokaryon samples, c) Two samples with incompatible mating type

منجر به اثبات هتروکاریونی نمونه خواهد شد ولی با عدم مشاهده دو باند در 9 کروموزوم، وجود هتروکاریونی در چهار کروموزوم دیگر همچنان محتمل می‌باشد، اما بر اساس محاسبات انجام شده (3) با

از آنجایی که نشانگرهای SSR مورد بررسی در این تحقیق 9 کروموزوم از 13 کروموزوم هاپلوئیدی این گونه را پوشش می‌دادند (12 و 13)، می‌توان دریافت که مشاهده دو باند در نمونه مورد بررسی

سپاسگزاری

احتراماً از گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

استفاده از نشانگر SSR، می‌توان با احتمال 99/8 درصد نسبت به قطعیت هموکاریون بودن یک نمونه با ده آغازگر موجود دست یافت.

منابع

- 1- Adams L. S., Chen S., Phung S., Wu X., and Ki L. 2008. White button mushroom (*Agaricus bisporus*) exhibits antiproliferative and proapoptotic properties and inhibits prostate tumor growth in athymic mice. *Nutrition and Cancer*, 60(6): 744-756.
- 2- Alipoor M., Farsi M., and Mirshamsi Kakhki A. 2014. Improvement of white Button Mushroom Yield by AFLP Marker-assisted Single Spore Selection Method. *Journal of Horticultural Science*, 28(3):327-337. (in Parsian)
- 3- Birati M., Malekzadeh Shafaroudi S., Malekzadeh Kh. and Mirshamsi Kakhki A. 2015. SSR markers for screening and estimating genetic distance of homokaryotic single spores in the white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 6(4):23-36. (in Parsian with English abstract)
- 4- Callac P., Spataro C., Caille A., and Imbernon M. 2006. Evidence for outcrossing via the Buller phenomenon in a substrate simultaneously inoculated with spores and mycelium of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2366-2372.
- 5- Castle A. J., Horgen P. A., and Anderson J. B. 1987. Restriction fragment length polymorphisms in the mushrooms *Agaricus brunnescens* and *Agaricus bitorquis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(4): 816-822.
- 6- Castle A. J., Horgen P. A., and Anderson J. B. 1988. Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (*A. bisporus*). *Applied and Environmental Microbiology*, 54(7): 1643-1648.
- 7- Cullings K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1(4): 233-240.
- 8- De La Bastide P.Y., Sonnenberg A., Van Griensven L.J.L.D., Anderson J.B. and Horgen P.A. 1997. Mitochondrial Haplotype Influences Mycelial Growth of *Agaricus bisporus* Heterokaryons. *Applied and environmental microbiology*, 63(9): 3426-3431.
- 9- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19: 11-15.
- 10- Farsi M., Jalalzadeh B., and Malekzadeh Kh. 2009. The breeding and production of hybrid strains of white button mushroom. *Proceeding of the 6th Iranian Horticultural Science Congress*, 2-15 Jul. 2009, Rasht, and I. R. Iran. (in Parsian)
- 11- Farsi M., and Pourian Far H. 2011. *Cultivation and breeding of white button mushroom*. JahadDaneshgahi Publications, Mashhad. (in Parsian)
- 12- Foulongne-Oriol M., Spataro C. and Savoie J.-M. 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(6): 1125-1135.
- 13- Foulongne-Oriol M., Spataro C., Cathalot V., Monllor S. and Savoie J.-M. 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(3): 226-236.
- 14- Foulongne-Oriol M., Spataro C., Moinard M., Cabannes D., Callac P. and Savoie J.-M. 2012. Development of polymorphic microsatellite markers issued from pyrosequencing technology for the medicinal mushroom *Agaricus subrufescens*. *FEMS Microbiology Letters*, 334(2): 119-126.
- 15- Gordan H.R., Mahmoudnia Meymand M., Zou Alali J., Khatamirad M., and Farsi M. 2008. A study of potential of AFLP markers to genetic fingerprinting of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology)*, 22(1): 27-36. (in Parsian with English abstract)
- 16- Ghorbani Faal P., Farsi M., Pourianfar H.R., Mahmoodnia M. and Zolala J. 2009. Preparation of AFLP Mediated-Molecular Certificate for 12 Bred Strains of the Button Mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Plant Protection*, 23(1): 58-67. (in Parsian with English abstract)

- 17- Heath M.C., Li A., Horgen P.A. and Tam P.L. 1995. Hyphal morphology associated with strain instability in the commercial mushroom, *Agaricusbisporus*. *Mycologia*, pp.442-450.
- 18- Horgen P. and Anderson J. 1992. Biotechnology and edible mushrooms. *Biotechnology and Filamentous Fungi*, Finklestein, D. and C. Ball (Eds.). Butter Worth, Boston, USA. ISBN, 750691158: 447-462.
- 19- Horgen P. A. and Castle A. 2002. Application and potential of molecular approaches to mushrooms. *Agricultural Applications*, Springer, 3-17.
- 20- Jolivet S., Arpin N., Wichers H.J. and Pellon G. 1998. *Agaricusbisporus* browning: a review. *Mycological Research*, 102(12): 1459-1483.
- 21- Kavousi H.R., Farsi M. and Shahriari F. 2008. Comparison of random amplified polymorphic DNA markers and morphological characters in identification of homokaryon isolates of white button mushroom (*Agaricusbisporus*). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(14): 1771-1778.
- 22- Kerrigan R.W. 1990. Evidence of genetic divergence in two populations of *Agaricusbisporus*. *Mycological Research*, 94(6):721-733.
- 23- Kerrigan R.W., Baller L.M., Horgen P.A. and Anderson J.B. 1992. Strategies for the efficient recovery of *Agaricusbisporus* homokaryons. *Mycologia*, 84(4): 575-579.
- 24- Kerrigan R.W., Royer J.C., Baller L.M., Kohli Y., Horgen P.A. and Anderson J.B. 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricusbisporus*. *Genetics*, 133(2): 225-236.
- 25- Kerrigan R.W. and Spear M.C., Sylvan Spawn Laboratory Incorporated. 1997. Method for the production of high proportions of homokaryons in breeding stock of the mushroom *Agaricusbisporus*. U.S. Patent NO. 5684228.
- 26- Kerrigan R.W. 2000. A brief history of marker assisted selection in *Agaricusbisporus*. *Science and Cultivation of Edible Fungi 2000*, 1:183.
- 27- Li R. and Fang X. 2002. Analysis of POD and EST isozyme of three *Agaricus species*. *Edible Fungi of China*, 21(4): 34-36.
- 28- Liu M.M., Xing Y.M., Zhang D.W. and Guo S.X. 2015. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in *Polyporusumbellatus* (Polyporales, Basidiomycota). *Biochemical Systematics and Ecology*, (61):450-457.
- 29- Ma F.Y. and Luo X.C. 2002. PCR-based restriction analysis of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in the genus.
- 30- Mahmud M. A., Kitaura H., Fukuda M. and Yamada A. 2007. AFLP analysis for examining genetic differences in cultivated strains and their single-spore isolates and for confirming successful crosses in *Agaricusblazei*. *Mycoscience*, 48(5): 297-304.
- 31- May B. and Royse D. J. 1982. Confirmation of crosses between lines of *Agaricusbrunnescens* by isozyme analysis. *Experimental Mycology*, 6(3): 283-292.
- 32- Miles P.G. and Chang S.T. 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. CRC press.
- 33- Miller R. E. 1971. Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricusbisporus*. *Mycologia*, 8: 630-634.
- 34- Miller R.E. and Kananen D.L. 1972. Bipolar sexuality in the mushroom. *MushroomSci*, 8:713-718.
- 35- Moore A., Challen M., Warner P. and Elliott T. 2001. RAPD discrimination of *Agaricusbisporus* mushroom cultivars. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(6): 742-749.
- 36- Mohammadi M., Jahadi M. and Khosravi-Darani K. 2013. *Agaricusbisporus*: Enzymatic browning and its inhibition methods. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7(4):63-71. (in Parsian with English abstract)
- 37- Murovec J., Stajner N., Jakse J. and Javornik B. 2007. Microsatellite marker for homozygosity testing of putative doubled haploids and characterization of *Mimulus* species derived by a cross-genera approach. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(5): 659-663.
- 38- Nazrul M. I., Lin F. X. and Yin-Bing B. 2010. Screening of homokaryotic protoclones of *Agaricusbisporus* (J. Lge) Imbach by colony characters and ISSR markers. *Bangladesh Journal of Botany*, 39(1): 119-122.
- 39- Nazrul M. I. and Yin-Bing B. 2010. ISSR as new markers for identification of homokaryotic protoclones of *Agaricusbisporus*. *Current Microbiology*, 60(2): 92-98.
- 40- Nazrul M. I. and Yin-Bing B. 2011. Differentiation of homokaryons and heterokaryons of *Agaricusbisporus* with inter-simple sequence repeat markers. *Microbiological research*, 166(3): 226-236.
- 41- Pandey M. and Tewari R. 1994. Strategies for selection and breeding of edible mushrooms. *Advances in Mushrooms Biotechnology*. Edited by: MC Nair, C. Gokulapalan and L. Dass. Scientific Publishers, Jodhpur, India: 61-69.

- 42- Ramírez L., Muez V., Alfonso M., Barrenechea A.G., Alfonso L. and Pisabarro A.G. 2001. Use of molecular markers to differentiate between commercial strains of the button mushroom *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiology Letters, 198(1): 45-48.
- 43- Raper C. A., Raper J. R. and Miller R. E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia, 1088-1117.
- 44- Richard G.F., Hennequin C., Thierry A. and Dujon B. 1999. Trinucleotide repeats and other microsatellites in yeasts. Research in Microbiology, 150(9): 589-602.
- 45- Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C. and Taylor P. 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. Journal of Functional Foods, 4(4): 687-709.
- 46- Royse D.J. and May B. 1982. Use of isozyme variation to identify genotypic classes of *Agaricus brunnescens*. Mycologia, 93-102.
- 47- Sánchez-Pérez R., Ruiz D., Dicenta F., Egea J. and Martínez-Gómez P. 2005. Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. Scientia Horticulturae, 103(3): 305-315.
- 48- Savoie J. M., Minvielle N. and Largeteau M. L. 2008. Radical scavenging properties of extracts from the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 88(6): 970-975.
- 49- Selkoe K.A. and Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9(5): 615-629.
- 50- Shehata A.I., Al-Ghethar H.A. and Al-Homaidan A.A. 2009. Application of simple sequence repeat (SSR) markers for molecular diversity and heterozygosity analysis in maize inbred lines. Saudi Journal of Biological Sciences, 16(2): 57-62.
- 51- Singer R. and Harris B. 1987. Mushrooms and truffles. Koeltz Scientific Books. Germany. 389pp.
- 52- Soltis Lab CTAB DNA extraction protocol. 2002. The soltis lab, florida museum of natural history, on line at: <http://www.flmnh.ufl.edu/soltislab>
- 53- Song S., Su W., Zeng W. and Wang Z. 2000. RAPD analysis of species diversity and genomic differences in *Agaricus bisporus*. Science and Cultivation of Edible Fungi 2000, 1: 191.
- 54- Sonnenberg A. S. M., Johan J. P. B., Hendrickx P. M., Lavrijssen B., Wei G., Weijn A., Mes J. J., Savoie J. M., Foulongne-Oriol M., Largeteau M. and Barroso G. 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In Mushroom biology and mushroom products. Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October.
- 55- Terashima K. and Matsumoto T. 2004. Strain typing of shiitake (*Lentinula edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat-dried fruiting body. Mycoscience, 45(1): 79-82.
- 56- Wang Y., Chen M., Wang H., Wang J.-F. and Bao, D. 2014. Microsatellites in the Genome of the Edible Mushroom, *Volvariella volvacea*. Biomed Research International 2014.
- 57- Xiao Y., Liu W., Dai Y., Fu C. and Bian Y. 2010. Using SSR markers to evaluate the genetic diversity of *Lentinula edodes*' natural germplasm in China. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(3): 527-536.
- 58- Yan P.-S. and Jiang J.-H. 2005. Preliminary research of the RAPD molecular marker-assisted breeding of the edible basidiomycete *Stropharia rugoso-annulata*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 21(4): 559-563.
- 59- Zhang R., Hu D., Zhang J., Zuo X., Jiang R., Wang H. and Ng T.B. 2010. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers for the mushroom *Flammulina velutipes*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 110(3): 273-275.
- 60- Zhao J. and Chang S.T. 1993. Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 9(5): 538-543.



Screening of the White Button Mushroom (*Agaricusbisporus*) Homokaryons and Producing New Hybrid Strain by SSR Markers

S. M. Nourashrafedin¹ - M. Farsi^{2*} - F. Shahriari² - J. Janpoor³

Received: 22-05-2017

Accepted: 23-07-2017

Introduction: Edible white button mushroom (*Agaricusbisporus*) is the most common edible mushroom in Iran and the world. The yield of this mushroom is less than the average of yield in the world because of strain degeneration and using strains with low yield. Most of the current hybrids are either identical or very similar to the first hybrids. Ongoing breeding programs are exploiting the variability in *Agaricus* germplasm to produce new varieties with better traits including higher yield and resistance to biotic and abiotic stresses. One of the breeding programs is F₁ production from parental homokaryons crossing. These homokaryons were isolated among germinated basidiospores on the culture media. During the last decades, various molecular markers based on nucleic acid polymorphisms (such as Restriction Fragment Length Polymorphism, Random Amplification of Polymorphic DNA, Amplified fragment of Length Polymorphism, Inter Simple Sequence Repeat, Simple Sequence Repeat markers) have been used to differentiate homokaryons and heterokaryons. Microsatellites consist of short tandem repeat motifs distributed throughout the genome. Microsatellites are usually highly polymorphic due to a high degree of variation in the number of repeats among individuals. Microsatellite markers are multiallelic and co-dominant and thus tend to be more informative than other marker systems. Microsatellite markers have been widely developed in animals and plants and more recently in fungal species. The presence of microsatellites in the genome of *A. bisporus* was previously reported.

Materials and Methods: In this research, 160 germinated basidiospores were collected from commercially cultivated strain A15 and they were grown on compost extract agar (CEA). The mycelial growth rate of these 160 isolates was evaluated at 25°C on CEA medium. 18 isolates with slow growing rate were selected from 160 isolates. In the next step, co-dominant SSR markers were used to homokaryons detection. Ten SSR primers showed polymorphism in parental control samples that were used to this experiment. The isolates were divided into two general homoallelic and heteroallelic groups and seven isolates from homoallelic group, which showed one-band pattern, characterized as putative homokaryon. Genetic similarity was calculated by NTSYSpc software version 2.02 e using UPGMA method. In the next step of experiment, the isolates (4 and 8) had minimum genetic similarity that was crossed to produce hybrid. In order to confirm the hybrid formation, PCR-SSR reaction with a primer (AbSSR 45) was performed.

Results and Discussions: Basidiospores were collected and allowed to germinate on CEA medium. Putative homokaryons were different in colony morphology and growth rate compared to the original heterokaryons. Mycelium samples showed different colony morphology including tomentose, appressed and strandy mycelium. Different growth rate can be affected by genetic factors in nucleus and mitochondria. After four weeks, mycelium browning was appeared in liquid compost extract medium and created a disturbance in DNA extraction. To solve this problem, DNA was extracted from three-week old mycelium. Mycelium browning may cause by phenolic compounds produced by mycelium and enzymes that catalyze melanin biosynthesis reactions. Ten primers were used to homokaryon isolation. These primers were situated on the 9 linkage groups of 13 haploid chromosomes. Seven isolates were distinguished as putative homokaryon that showed one-band in all primers on the gel electrophoresis. The results of genetic similarity calculation showed that this index was variable between 0.17 to 0.67 in 7 homokaryon isolates and the minimum genetic similarity (0.17) was observed between isolates 4 and 8. These two isolates were crossed and the result of this crossing was N1 hybrid. Also, other homokaryon isolates were crossed and mating incompatibility was observed in some of them. According to these observations, it is suggested that in future studies, in addition to genetic similarity, sexual incompatibility should also be considered. Hybrid N1 produced aerial mycelium and had higher growth rate in comparison to

1, 2 and 3- PhD Student and Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(* - Corresponding author Email: Farsi@um.ac.ir)

4-Department of Industrial Fungal Biotechnology, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad branch, Iran

parental homokaryons and similar to heterokaryon control, had two-bands pattern. This two bands pattern indicates the presence of two non-sister nucleuse in each cells. Finally, the results showed that SSR marker can result to accurate detection of homokaryons.

Conclusions: The aim of the present study was screening homokaryon isolates of *A.bisporus* using SSR markers to obtain hybrid. Results showed that growth rate of homokaryon isolates were lower than the heterokaryons. Since, SSR markers were able to show high polymorphism in the isolates, thus it can be said that these markers are suitable to homokaryon screening. Final result of this study is N1 hybrid that can compare to commercially cultivated strains.

Keywords: Genetic variation, Morphological variation, Heterokaryon and Codominant marker