نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۴۱۱-۴۰۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 401-411
ISSN: 2008 - 4730

بررسی امکان انتقال cDNA ژن منگنزپراکسیداز (*mnp*) از قارچ صدفی به قارچ دکمه‌ای سفید با کمک آگروباکتریوم

مژگان پروندی[۱]- محمد فارسی[۲*]- محسن اشرفی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۰۳

چکیده

قارچ دکمه‌ای سفید یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در دنیا به شمار می‌رود که در برداشت سوم محصول قابل قبولی تولید نمی‌کند. دلیل این امر کاهش مواد غذایی و ناتوانی این قارچ در استفاده بهینه از کمپوست ذکر شده است. تغییر بیان یا نوع آنزیم‌های موثر در تجزیه ترکیبات لیگنینی نظیر منگنزپراکسیداز راه‌حل‌های احتمالی حل این مشکل می‌باشند، که به نظر می رسد بتوان با بهره‌گیری از روش انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم به این هدف دست یافت. در این پژوهش از قارچ خوراکی صدفی واریته فلوریدا به‌عنوان منبع ژن منگنزپراکسیداز و بافت‌های تیغه و کلاهک قارچ دکمه‌ای سفید نژاد ۷۳۷ به‌عنوان گیرنده ژن استفاده شدند. باکتری آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 دارای پلاسمید p13H88-FM نیز به‌عنوان ناقل به کار رفت. محیط کشت گزینشگر حاوی ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین برای انتخاب ریزنمونه‌های تراریخت مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه‌های تیغه که نرخ تراریزش آن‌ها پنج درصد بود، بهتر از ریزنمونه‌های کلاهک که نرخ تراریزش آن‌ها صفر درصد بود، به روش تراریزش مورد استفاده پاسخ دادند. علاوه بر توانایی رشد بر روی محیط کشت انتخابی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *hph* و *mnp* به‌عنوان یکی از روش‌های تأیید تراریختگی، سبب تکثیر قطعات به ترتیب ۱۰۴۹ و ۱۰۸۶ نوکلئوتیدی شد و تراریختگی کلنی‌های قارچی را تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: آگروباکتریوم، انتقال ژن، تجزیه لیگنین، قارچ دکمه‌ای سفید، کمپوست

مقدمه

قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی به شمار می‌رود که باوجود ارزش اقتصادی و اهمیت بیوتکنولوژیکی فراوان، تکنیک‌های اصلاحی برای به‌کارگیری این پتانسیل‌ها کارساز نبوده‌اند. بزرگ‌ترین و جدی‌ترین مشکل در برنامه‌های اصلاحی قارچ دکمه‌ای سفید چرخه زندگی هموتالیک ثانویه آن است (۱۱)؛ بنابراین اصلاح نژاد در این موجود به دلیل تنوع ژنتیکی بسیار پایین در بین لاین‌های تجاری راندمان چندانی ندارد (۱۳). در این گونه موارد، یکی از راه‌های جایگزین روش‌های اصلاحی سنتی، تراریزش ژنتیکی می‌باشد. تراریزش ژنتیکی تکنولوژی قدرتمندی است که از طریق آن ژن‌ها می‌توانند در داخل یا بین جنس‌های مختلف انتقال داده شوند. همچنین تراریزش یک پیش‌نیاز برای مشخص کردن کارکرد ژن‌ها و پایه آنالیزهای بیولوژیکی می‌باشد که می‌تواند به‌طور مستقیم باعث بهبود نژادها و پیش‌دستی کردن بر اصلاح مرسوم، از طریق اضافه کردن ژن‌های جدید و یا تغییر بیان ژن‌های موجود شود (۱۵).

در سال‌های اخیر، روش‌های مختلف انتقال ژن به موجودات مختلف گسترش یافته است که انتقال ژن از طریق آگروباکتریوم که یک باکتری خاکزی و گرم منفی است، به دلیل برتری الگوی الحاق ژن، سادگی و کم‌هزینه بودن آن، به‌طور متداول‌تری برای انتقال ژن به گیاهان و سایر موجودات از جمله قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰). استفاده از آگروباکتریوم در انتقال ژن به گونه‌های قارچی، ابتدا در مخمر نان *Saccharomyces serevicie* و متعاقب آن در بسیاری از قارچ‌های رشته‌ای، از جمله قارچ دکمه‌ای سفید گزارش گردید. اولین گزارش تراریختی در قارچ دکمه‌ای سفید به وسیله آگروباکتریوم توسط دوگروت با استفاده از بازیدیوسپورهای در حال جوانه‌زنی صورت گرفت هرچند نرخ تراریختی در این تجربه چندان بالا نبود (۲۰). بررسی‌های صورت گرفته نشان دادند عوامل متعددی در میزان کارایی تراریختگی مبتنی بر آگروباکتریوم نقش دارند. ریزنمونه و مرحله

۱ و ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mohfarsi@yahoo.com
DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.53686

رشدی آن، نژاد آگروباکتریوم، نوع پلاسمید حامل، نوع ژن و پیشبر مورد استفاده از جمله این عوامل می‌باشند. به‌طورکلی بافت‌های تشکیل‌دهنده اندام باروری قارچ دکمه‌ای خصوصاً بافت مولد اسپور نسبت به سایر اندام‌های قارچی از جمله بازیدیوسپورها و میسلیوم رویشی نرخ تراریزش بالاتری را نشان می‌دهند (۸ و ۴). چن و همکاران (۸) با تغییر پیشبر 35S پلاسمید pCAMBIA1300 و جایگزین نمودن پیشبر gpdII قارچ دکمه‌ای سفید، پلاسمید دیگری به نام pBGgHg ساختند و بدین‌وسیله انتقال و بیان ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز را تحت یک پیشبر همولوگ بررسی نمودند. در این آزمایش نرخ تراریزش به‌دست‌آمده، هفت برابر بیشتر از تراریزش بازیدیوسپورها بود. علت نرخ پایین تراریزش در آزمایشات قبلی شاید به دلیل نرخ پایین جوانه‌زنی اسپورها و یا استفاده از پیشبرهای هترولوگ بوده است.

مطالعات نشان داده اند که اکثر نیازهای غذایی برای رشد میسلیوم و توسعه قارچ از لیگنین، سلولز، همی سلولز و پروتئین به دست می‌آید (۶). یکی از مشکلات موجود در صنعت پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید، کاهش و یا توقف تولید در برداشت سوم است که به نظر می‌رسد عامل اصلی این مشکل، اتمام مواد غذایی برای مصرف این قارچ و عدم توان استفاده بهینه از کمپوست تولید شده باشد. درنتیجه، استفاده از کمپوست نیازمند توانایی تولید مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کننده ترکیبات لیگنینی در قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد (۱۶). آنزیم منگنزپراکسیداز (*mnp*)، یکی از عمومی‌ترین پراکسیدازهای تجزیه‌کننده لیگنین است که توسط اکثر قارچ‌های تجزیه‌کننده چوب و نیز بسیاری از قارچ‌های تجزیه‌کننده کمپوست از جمله قارچ دکمه‌ای سفید تولید می‌شود (۱۲). این آنزیم در اوایل دوره میوه دهی قارچ دکمه‌ای سفید و قارچ صدفی (*Pleurotus stratus*) از میسلیوم رویشی تولید می‌شود و حداکثر فعالیتش نیز در همین مرحله رشدی می‌باشد، اما با بلوغ میوه فعالیت این آنزیم در قارچ دکمه‌ای کاهش می‌یابد به صورتی که با بلوغ میوه میزان لیگنین کمپوست نیز به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۲). مطالعات نشان می‌دهند که قارچ‌هایی که آنزیم MNP فعال‌تر و درنتیجه توانایی بیشتری در تجزیه ترکیبات لیگنینی دارند، از سرعت رشد بالاتری نیز برخوردارند (۲۳)؛ بنابراین ازآنجاکه قارچ صدفی سرعت رشد بیشتری نسبت به قارچ دکمه‌ای دارد، آنزیم MNP قوی‌تری نیز نسبت به قارچ دکمه‌ای خواهد داشت. این آنزیم برون سلولی معمولاً دارای جرم مولکولی ۵۰-۴۰ KDa (حداکثر ۶۲-۳۸ KDa) است و pI آن بین ۳ و ۷ تغییر می‌کند و معمولاً حدود ۴-۳ است (۱۲). گزارش شده است که این آنزیم علاوه بر داشتن نقش پراکسیدازی، دارای فعالیت اکسیدازی نیز می‌باشد. این آنزیم نه تنها ترکیبات لیگنینی و فنولی را می‌شکند، بلکه مواد غیر فنولیکی که در حضور موادی خاص به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای تبدیل می‌شوند را نیز با استفاده از اکسیداسیون Mn^{+2} به Mn^{+3} و با کمک H_2O_2 به‌عنوان اکسیدانت، اکسید می‌کند (۲۳). قارچ صدفی تجزیه کننده اولیه است و توانایی بیشتری در تجزیه ترکیبات سلولوزی دارد. با انتقال ژن منگنزپراکسیداز (*mnp*) از این قارچ به قارچ دکمه‌ای امکان افزایش پتانسیل تجزیه ترکیبات سلولزی در قارچ دکمه‌ای وجود دارد. این پژوهش با هدف بررسی امکان انتقال ژن *mnp* از قارچ خوراکی صدفی (*P. ostreatus* var. *florida*) که بیشتر به‌عنوان یک قارچ تجزیه‌کننده پسماندهای لیگنوسلولزی شناخته می‌شود، به قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

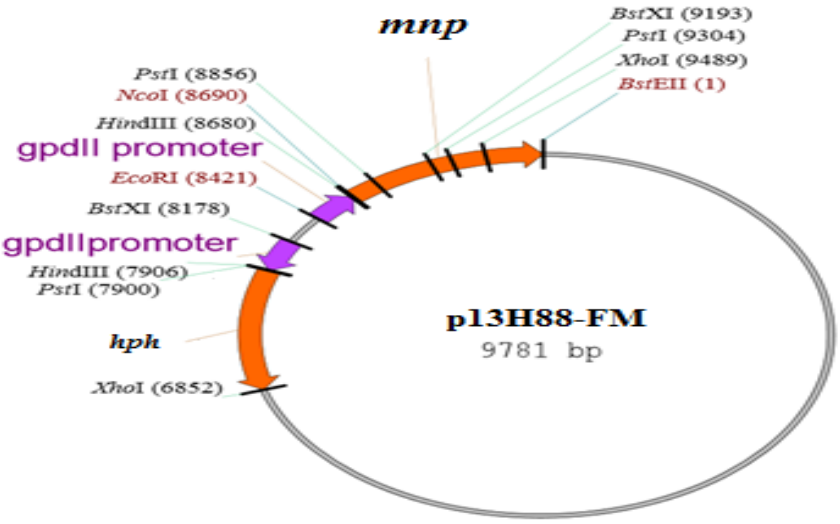
نژادهای قارچی، پلاسمید و باکتری‌های مورد استفاده

در این بررسی از سویه تجاری قارچ خوراکی صدفی (نژاد فلوریدا) به‌عنوان منبع ژن *mnp* و قارچ دکمه‌ای سفید (نژاد ۷۳۷) برای تولید قارچ تراریخت استفاده شد. کشت این نژادها از مرکز تولید اسپاون جهاد دانشگاهی واحد مشهد تهیه شدند. برای هم کشتی از باکتری آگروباکتریوم[1] (نژاد LBA4404) استفاده شد. این باکتری دارای پلاسمید p13H88-FM که حاصل کارهای اشرفی و همکاران (۱) و پروندی و همکاران (۱۸) است، می‌باشد. ژن *mnp* موجود در این پلاسمید تحت کنترل پیشبر gpdII قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشد. در این پلاسمید ژن هیگرومایسین B فسفوترانسفراز به‌عنوان انتخاب‌گر قارچ‌های تراریخت مورد استفاده قرار گرفته است که آن هم تحت کنترل پیشبر gpdII می‌باشد. نمای شماتیک پلاسمید مذکور در شکل ۱ نشان داده شده است.

طراحی آغازگرهای ژن‌های *hph* و *mnp* واکنش PCR: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های *hph* و *mnp* با استفاده از نرم‌افزار Primer Premier V.5.0 طراحی شدند و به ترتیب توسط شرکت متابیون (آلمان) و ماکروژن (کره جنوبی) سنتز گردیدند. توالی‌های رشته رفت و برگشت این آغازگرها در ژن *hph* به ترتیب *hph*-F 5'CACATCTCGAGTCGGCATCTA3' و *hph*-R 5'GCACTGCAGATGAAAAAGCC3' و در ژن *mnp* 5'ATACCATGGATGACCTTTGCTTCGCTTTC3' و *mnp*-F 5'TTAGGTAACCTTACGCAGGTGGGACACG3' *mnp*-R می‌باشند. برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ژن‌های *mnp* و *hph* به‌صورت، چرخه نخست ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه بعدی، ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد (برای ژن *hph*) و ۵۵ درجه سانتی‌گراد (برای ژن *mnp*) به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه

1- *Agrobacterium tumefaciens*

سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد.



شکل ۱- نمای شماتیک پلاسمید p13H88-FM
Figure 1-p13H88-FM Schematic View

مخلوط اجزای واکنش PCR شامل یک میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت (۱۰ پیکومول)، ۱۵۰ نانوگرم DNA، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۱۰ میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (۱۰X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر تک پلیمراز (5 U/µL) می‌باشد که حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد (۷).

انتقال پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *mnp* (p13H88–FM) به آگروباکتریوم سویه‌ی LBA4404 و تأیید به روش کلنی PCR: پس از ایجاد باکتری‌های مستعد، ترانسفورماسیون به روش Freeze-thaw Transformation (۲۱) انجام گرفت. جهت تأیید کلنی‌های باکتریایی تشکیل شده بر روی محیط کشت LB انتخابی دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، از روش کلنی PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *mnp* و برنامه دمایی و همچنین مخلوط اجزای واکنش گفته شده در بالا استفاده شد. جهت بررسی تکثیر ژن *mnp*، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد با بافر (۱X) TAE استفاده گردید.

مراحل انتقال ژن *mnp*: یک کلنی از باکتری آگروباکتریوم تراریخته شده با ناقل p13H88-FM به منظور آماده‌سازی برای انجام واکنش تراریزش قارچ دکمه‌ای سفید انتخاب و سایر مراحل آزمایش مطابق چارت ذیل انجام شد:

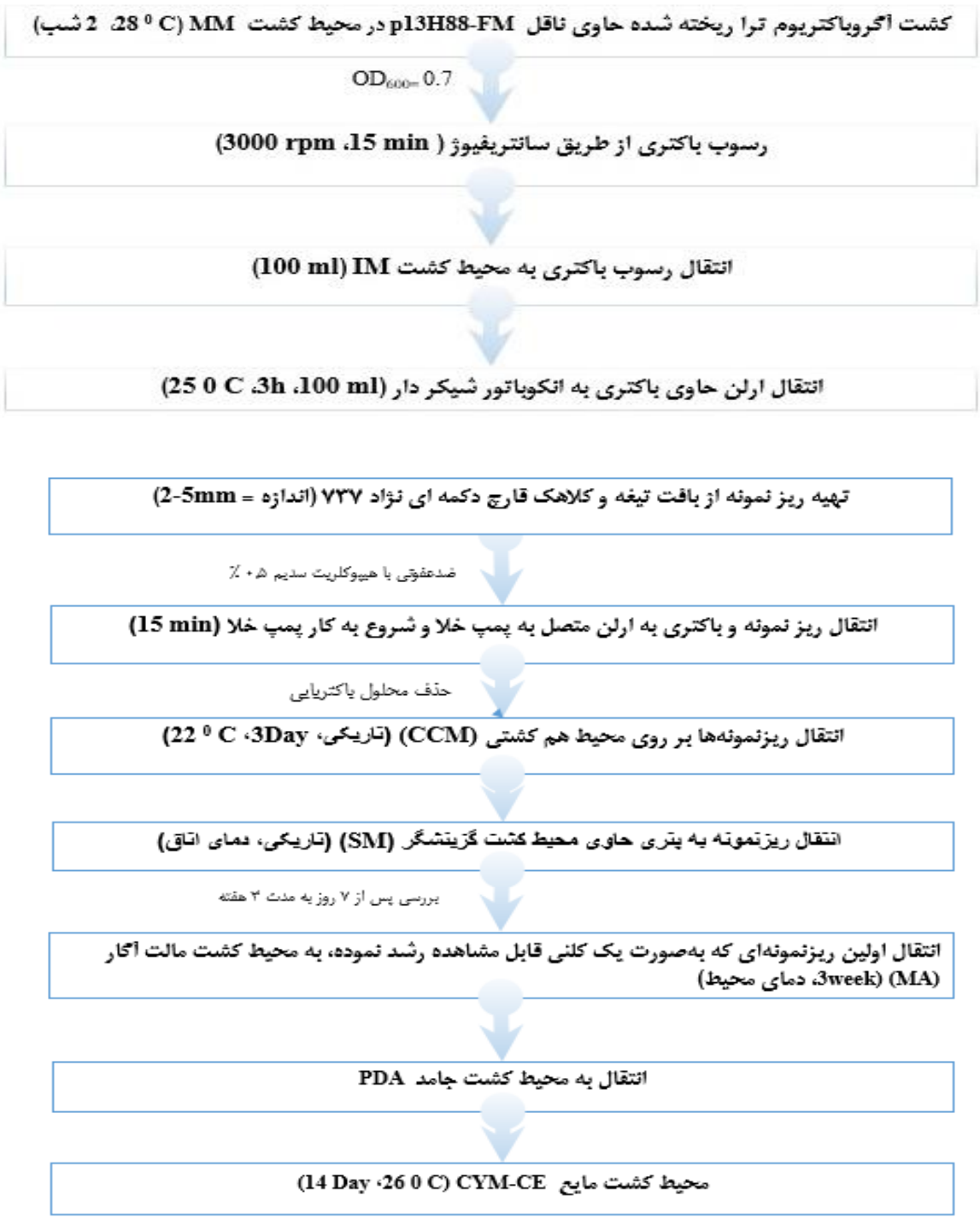
در این آزمایش جهت بررسی قدرت رشدی ریزنمونه‌های کلاهک و تیغه، از محیط کشت گزینشگر فاقد آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین نیز استفاده شد.

تأیید تراریختی کلنی‌های قارچی با استفاده از آزمون PCR: در ابتدا با استفاده از کیت Rapid Fungal Genomic DNA Isolation Kit (Bio Basic lnc, FT 71415) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده DNA ژنومی کلنی‌های قارچ دکمه‌ای رشد یافته بر روی محیط کشت گزینشگر استخراج شدند. جهت بررسی کمی و کیفی DNAی استخراجی، دستگاه (Nanodrop NanoDrop™ (2000, UV-Vis spectrophotometer و همچنین ژل آگارز یک درصد با بافر TAE (1X) مورد استفاده قرار گرفتند.

در مرحله بعد، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *mnp* و *hph* بر روی DNAی ژنومی استخراج شده از کلنی‌های قارچی انتخابی، برای تأیید تراریختی کلنی‌ها مورد استفاده قرار گرفت. طول ژن *hph*، حدود ۱۰۴۹ جفت باز و ژن *mnp* حدود ۱۰۸۶ جفت باز می‌باشد. محصولات واکنش PCR بر روی ژل آگارز یک درصد با بافر TAE (۱X) با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت یک ساعت تفکیک شدند.

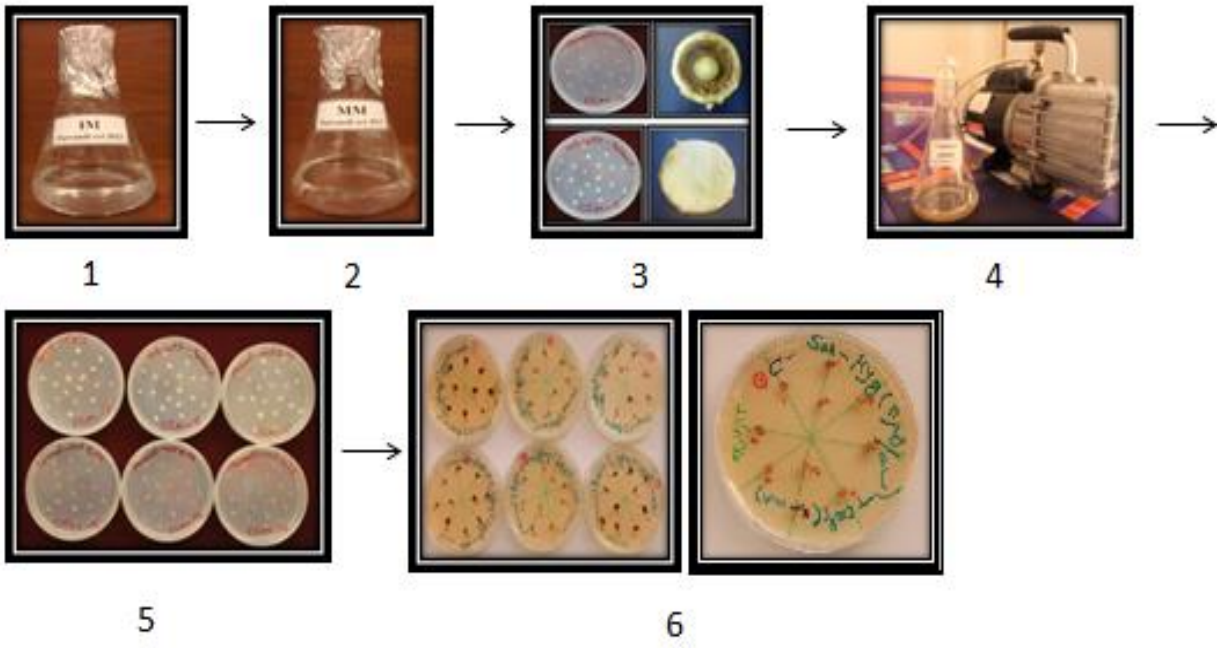
نتایج: تأیید انتقال پلاسمید نوترکیب p13H88-FM به باکتری آگروباکتریوم سویه LBA4404 با استفاده از تکنیک کلنی PCR:

در آزمایش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *mnp* بر روی کلنی‌های باکتریایی قطعه‌ای منطبق بر اندازه مورد انتظار (۱۰۸۶ bp) تکثیر شد که تأییدکننده حضور ناقل مزبور در کلنی‌های ترانسفورم شده می‌باشد (شکل ۳).


کشت آگروباکتریوم ترا ریخته شده حاوی ناقل p13H88-FM در محیط کشت MM (28 0 C، 2 شب)
OD600= 0.7
رسوب باکتری از طریق سانتریفیوژ (3000 rpm ،15 min)
انتقال رسوب باکتری به محیط کشت IM (100 ml)
انتقال ارلن حاوی باکتری به انکوباتور شیکر دار (25 0 C ،3h ،100 ml)
تهیه ریز نمونه از بافت تیغه و کلاهک قارچ دکمه ای نژاد ۷۳۷ (اندازه = 2-5mm)
ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۰٫۵ ٪
انتقال ریز نمونه و باکتری به ارلن متصل به پمپ خلا و شروع به کار پمپ خلا (15 min)
حذف محلول باکتریایی
انتقال ریزنمونه‌ها بر روی محیط هم کشتی (CCM) (تاریکی، 3Day ،22 0 C)
انتقال ریزنمونه به پتری حاوی محیط کشت گزینشگر (SM) (تاریکی، دمای اتاق)
بررسی پس از ۷ روز به مدت ۳ هفته
انتقال اولین ریزنمونه‌ای که به‌صورت یک کلنی قابل مشاهده رشد نموده، به محیط کشت مالت آگار (MA) (3week، دمای محیط)
انتقال به محیط کشت جامد PDA
محیط کشت مایع CYM-CE (14 Day ،26 0 C)

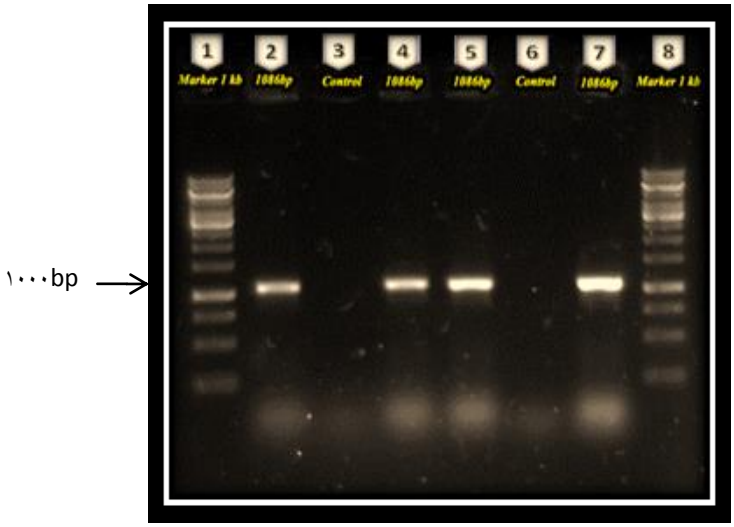
جدول ۱-ترکیبات محیط کشت

محیط کشت Culture medium	علامت اختصاری Abbreviation	ترکیبات محیط کشت Components of culture medium
حداقل Minimal	MM	۵ میلی‌لیتر بافر K7، ۱۰ میلی‌لیتر محلول M-N، ۰/۵ محلول $CaCl_2$، ۵ میلی‌لیتر محلول گلوکز، ۵ میلی‌لیتر محلول $FeSO_4$، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول عناصر، ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول NH_4NO_3، ۲ میلی‌لیتر محلول کانلمایسین 5 ml of K7 buffer, 10 ml of M-N solution, 0.5 ml of $CaCl_2$, 5 ml of glucose solution, 5 ml of $FeSO_4$ solution, 2.5 ml of elements solution, 1.25 ml of NH_4NO_3 solution, 2 ml of kanamycin solution
القائی Induction	IM	۰/۴ میلی‌لیتر بافر K4، ۱۰ میلی‌لیتر محلول M-N، ۰/۵ محلول $CaCl_2$، ۵ میلی‌لیتر محلول گلوکز، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول عناصر، ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول NH_4NO_3، ۵ میلی‌لیتر محلول گلیسرول، ۲۰ میلی‌لیتر بافر MES، ۲ میلی‌لیتر محلول کانلمایسین، ۲ میلی‌لیتر محلول استوسیرینگون 0.4 ml of K4 buffer, 10 ml of M-N solution, 0.5 ml of $CaCl_2$, 5 ml of glucose solution, 2.5 ml of elements solution, 1.25 ml of NH_4NO_3 solution, 2 ml of kanamycin solution, 2 ml of acetosyringone solution
هم کشتی Co-cultivation	CCM	محیط کشت القائی، ۲/۵ میلی‌لیتر محلول گلوکز، ۷/۵ گرم آگار Induction medium, 2.5 ml of glucose solution, 7.5 g of agar
گزینشگر Selective	SM	۱۰ گرم عصاره مالت، ۱/۰۵ گرم MOPS، ۷/۵ گرم آگار 10 g of malt extract, 1.05 g of MOPS, 7.5 g of agar
مالت آگار Malt agar	MA	۲ گرم عصاره مالت، ۱/۲ گرم MOPS، ۱۵ گرم آگار 2 g of malt extract, 1.2 g of MOPS, 15 g of agar
جامد Solid	PDA	۲۰۰ میلی لیتر عصاره سیب‌زمینی، ۱۰ گرم دکستروز، ۱/۵ گرم عصاره مالت 200 ml of potato extract, 10 g of dexterous, 1.5 g of malt extract
مایع Liquid	CYM-CE	۲۰۰ میلی لیتر عصاره کمپوست، ۲۰ میلی‌لیتر محلول CYM 200 ml of compost extract, 20 ml of CYM solution



شکل ۲- شمای کلی مراحل انتقال ژن در قارچ *A. bisporus* ۱. محیط کشت حداقل (MM)، ۲. محیط کشت القائی (IM)، ۳. قارچ مورد استفاده، ٤. پمپ خلأ، ۵. محیط کشت هم کشتی (CCM)، ٦. محیط کشت انتخابی (SM) همراه با کنترل (نمونه‌های تراریخت نشده)

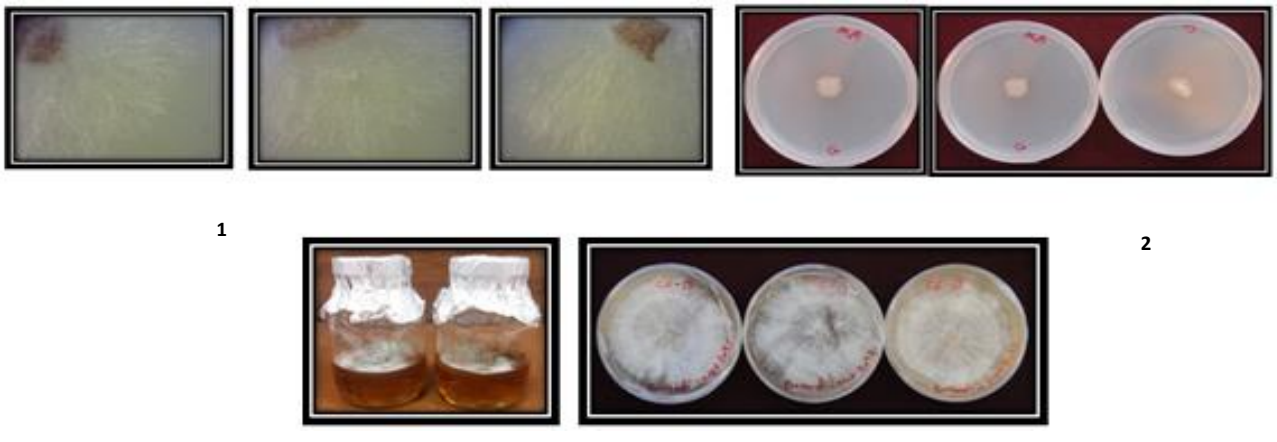
Figure 2- *A.bisporus* Gene Transformation Basic Schema. 1. Minimal Culture Medium (MM). 2. Induction Culture Medium (IM). 3. Used Mushroom. 4. Vacuum Pump. 5. Co-Cultivation Medium 6.Selection Medium (SM) With Control (Nontransgenic Samples)



شکل ۳- الکتروفورز محصول واکنش کلنی PCR بر روی کلنی‌های باکتریایی انتخابی بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۵، ٤٥ دقیقه) چاهک شماره ۱ و ۸: نشانگر اندازه 1Kb (Fermentas. SM1163) ، چاهک شماره ۳ و ٦: کنترل منفی برای واکنشColony PCR (الگو=آب)، چاهک شماره ٤: کنترل مثبت برای واکنش Colony PCR (الگو= پلاسمید حاوی ژن *mnp*)، چاهک شماره ۲ و ٤ و ٥ و ۷: محصول PCR ژن *mnp* (۱۰۸٦ bp)

Figure 3- PCR Colony Reaction Product On Selection Bactria Colony On 1% Agarose Gel. (TAE Buffer 95 V, 45 min) 6 : Negative Control For Colony PCR Reaction. No 1&8: 1KB Size Marker (Fermentas SM1163). Hell No 3, (Template=Water). Hell NO 4: Positive Control for Colony PCR (Template= Plasmid With *mnp* Gel). Hell No 2 & 4 &5 &7: Hell (1086 bp). *mnp* Gene PCR Product

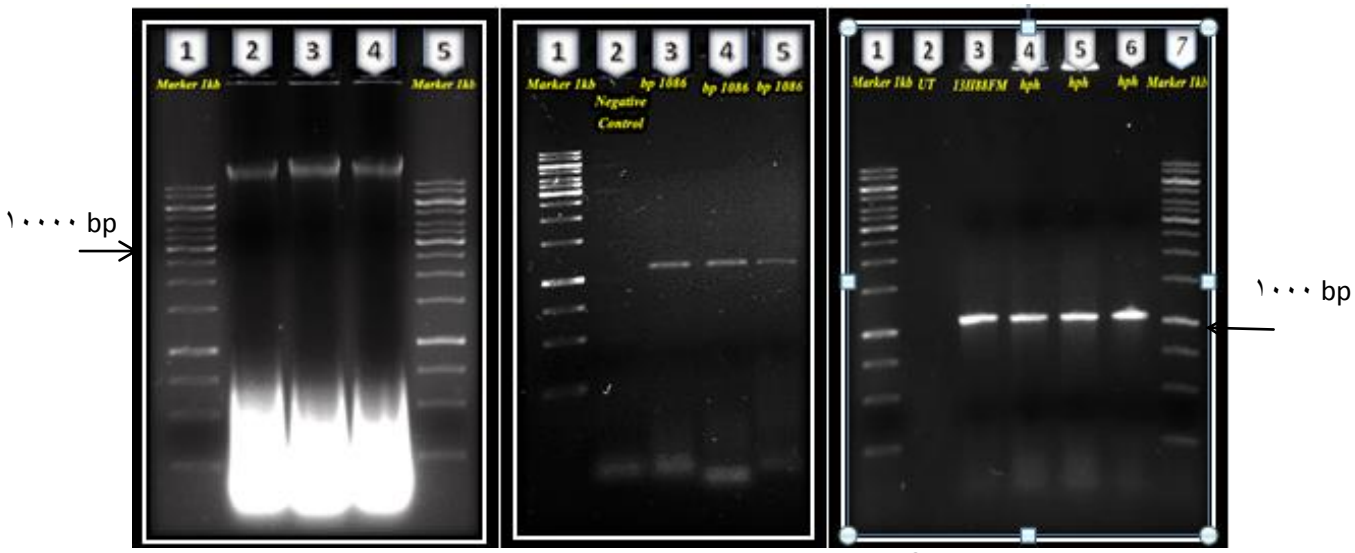
رشد ریزنمونه بافت تیغه در محیط کشت گزینشگر حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین B: از ۶۰ ریزنمونه تیغه تیمار شده با غلظت OD_{600} = ۰.۷ باکتری، سه ریزنمونه بر روی محیط کشت گزینشگر حاوی آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین B (۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تشکیل کلنی میسلیومی دادند. در شکل ۴ -۱ تصویر میکروسکوپی رشد این ریزنمونه‌ها که با میکروسکوپ دیجیتالی Digital Microscope Dino Lite AM-313T عکس‌برداری گردید، مشاهده می‌شود. تعدادی از ریزنمونه‌های کلاهک که در محیط کشت فاقد هیگرومایسین کشت شده بودند، رشد نکردند، اما تمام ریزنمونه‌های تیغه زنده مانده و کلنی میسلیومی تشکیل دادند.



شکل ٤- رشد میسلیوم‌های تراریخت روی (۱) محیط کشت گزینشگر، (۲) محیط کشت مالت اکار، (۳) محیط کشت PDA و (٤) محیط کشت مایع CYM-CE

PDA Culture Figure 4- Transgenic Mycelium Growth (1) Selector Culture Medium (2) Malt Agar Medium Culture (3) Medium (4) Liquid Culture Medium CYM-CE

رشد ریزنمونه‌ها بر روی محیط کشت مالت آگار و محیط کشت PDA و CYM-CE مایع: ریزنمونه های رشد یافته بر روی محیط کشت گزینشگر پس از انتقال به محیط کشت مالت آگار مطابق شکل ۴-۲ رشد کردند. کلنی‌های میسلیومی حاصل از رشد ریزنمونه‌های تراریخته در محیط مالت آگار ابتدا به محیط کشت PDA و سپس CYM-CE مایع منتقل شدند و همان‌طور که انتظار می‌رفت پس از گذشت ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد میسلیوم‌ها در سطح محیط کشت مشاهده گردید (شکل ۴ -۳و ۴-۴)



شکل ۵- (1) نمونه DNA استخراج شده، (2) تکثیر ژن *mnp*، (3) تکثیر ژن *hph*. 1: الکتروفورز DNA ژنومی قارچ دکمه‌ای سفید بر روی آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۵، ۵۵ دقیقه) چاهک ۱ و ۵: سایز مارکر 1Kb (Fermentas, SM1163)، چاهک شماره ۲ و ۳ و ٤: DNAهای استخراج شده. 2: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *hph* در ریزنمونه‌های تراریخت قارچ دکمه‌ای سفید بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۵، ۵۰ دقیقه) چاهک شماره ۱ و ۵: سایز مارکر 1kb (Fermentas, SM1163)، چاهک شماره ۲: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قارچ دکمه‌ای سفید تراریخت نشده (NonT) به‌عنوان کنترل منفی، چاهک شماره ۳: کنترل مثبت (پلاسمید p13H88-FM حاوی ژن *mnp*)، چاهک شماره ٤ و ۵: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *hph*. 3: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *mnp* در ریزنمونه‌های تراریخت قارچ دکمه‌ای سفید بر روی ژل آگارز یک درصد (بافر TAE، ولتاژ ۹۵، ۵۰ دقیقه). چاهک شماره ۱ و ۷: سایز مارکر 1kb (Fermentas, SM1163)، چاهک شماره ۲: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قارچ دکمه‌ای سفید تراریخت نشده (NonT) به‌عنوان کنترل منفی، چاهک شماره ۳ و ٤ و ۵: محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن *mnp* ریزنمونه‌های تراریخت

Figure 5- (1) Extracted DNA Sample, (2) *mnp* Gene Reproduction (3) *hph* Gene Reproduction, 1: *A.bisporus* Genome DNA Electrophoresis On 1% Agarose (TAE buffer,95 V,55 min) Hell No 1&5 : 1kb Size Marker (Fermentas SM1163), Hell 2,3,4: Extracted DNA's . 2: *hph* Gene Polymerase Chain Reaction Product In transgenic in transgnic *A.bisporus* Explants on 1% Agar Gel (TAE Buffer, 95 V, 50 min) Hell No 1,5: 1kb Size Marker (Fermentas, SM1163), Hell 2: Non transgenic Polymerase Chain Reaction Product as negative control, Hell 3: positive control (p13H88-FM contain *mnp* gene), Hell 4 & 5: *hph* Gene Polymerase Chain Reaction Product, 3: *mnp* Gene Polymerase Chain Reaction Product In transgenic *A.bisporus* Explants on 1% Agar Gel (TAE Buffer, 95 V, 50 min). Hell 1&7: 1kb Size Marker (Fermentas, SM1163), Hell 2: Non transgenic Polymerase Chain Reaction Product as negative control, Hell 3&4&8: *mnp* Polymerase Chain Reaction Product in transgenic *A.bisporus* Explants

استخراج DNA ژنومی از میسلیوم کلنی‌های رشد یافته بر محیط کشت گزینشگر و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن‌های *hph* و *mnp*:

نتایج الکتروفورز DNA ژنومی قارچ دکمه‌ای سفید درستی DNA استخراج شده را تأیید کرد. نسبت A_{260}/A_{280} در نمونه‌های استخراج شده به ترتیب از چاهک شماره ۲ و ۳ و ۴ عبارت بودند از: ۱.۲۳±۱، ۱.۸۳±۱ و ۱.۵۷±۱ بود (شکل ۵ -۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *mnp* سبب تکثیر قطعه ۱۰۸۶ نوکلئوتیدی مورد انتظار از DNA ژنومی قارچ‌های انتخابی از محیط کشت گزینشگر شد و هیچ گونه قطعه‌ای از DNA ژنومی قارچ غیر تراریخت که به‌عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفته بود، تکثیر

نکرد (شکل ۵ -۲). قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید فاقد ژن *hph* می‌باشد لذا انتظار می‌رفت که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی DNA ژنومی قارچ‌های غیر تراریخت هیچ‌گونه محصولی نداشته باشد اما سبب تکثیر قطعه تقریباً ۱۰۵۰ نوکلئوتیدی بر روی DNA ژنومی قارچ‌های انتخاب شده از روی محیط کشت گزینشگر شود (شکل ۵-۳).

بحث: رشد میسلیوم قارچ بر روی محیط کشت گزینشگر به دلیل رفع مسمومیت حاصل از آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین می‌باشد که به نوعی نشان دهنده بیان ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین یا همان هیگرومایسین فسفوترانسفراز می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ژن *mnp* نیز به‌خوبی بیان می‌شود، اما مطالعات بیشتری در خصوص میزان بیان این ژن و همچنین میزان فعالیت این آنزیم لازم است. مثبت بودن واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای هر دو ژن دلیل دیگری بر تراریخت بودن کلونی‌های رشد کرده بر روی محیط کشت گزینشگر می‌باشد. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای اثبات تراریختگی قارچ دکمه‌ای خوراکی در تعدادی از مطالعات مورد استفاده قرار گرفته است (۸، ۲۰ و ۳). از ۶۰ ریزنمونه بافت کلاهک، هیچ‌گونه ریزنمونه تراریختی مشاهده نگردید درحالی‌که از ۶۰ ریزنمونه بافت تیغه ۳ ریزنمونه تراریخت (۵ درصد) دیده شد. چلوارفروش و همکاران (۷) نیز با استفاده از سویه LBA4404 آگروباکتریوم و پلاسمید pCAMBIA1304 که همان پلاسمید مادری مورد استفاده در آزماش حال حاضر است با این تفاوت که ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز تحت کنترل پیشبر CaMV 35s بود، توانستند از بین ۲۰۲ ریزنمونه تیغه قارچ تحت آزمایش تراریختی به دو نمونه تراریخت دست پیدا کنند که نرخ تراریزشی برابر با ۰/۹۹ درصد می‌باشد. برنز و همکاران (۴) نیز با استفاده از پلاسمید pBGgHg حاصل از پلاسمید pCAMBIA1300 که از پیشبر gpdII برای کنترل ژن مقاومت به هیگرومایسین بهره‌مند بود و ریزنمونه‌های تیغه و به کمک سویه AGL-1 آگروباکتریوم به تراریزش قارچ دکمه‌ای پرداختند، توانستند به نرخ تراریختگی ۸۰/۴ درصد دست یابند. نتایج حاصل از زنده‌مانی تیغه‌ها بر روی محیط فاقد هیگرومایسین این گمان که شاید عدم رشد ریزنمونه‌ها در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیگرومایسین ناشی از عدم قدرت رشد تیغه‌ها باشد و نه اثر آنتی‌بیوتیک را رد کرد. عدم زنده‌مانی تعدادی از ریزنمونه‌های کلاهک در محیط کشت فاقد هیگرومایسین احتمالاً ناشی از باقی ماندن مقداری از هیپوکلریت سدیم است که به دلیل اسفنجی بودن بافت این ریزنمونه در زمان شستشو از آن خارج نشده است، اما در ریزنمونه‌های تیغه به دلیل سطح تماس بیشتر و داشتن سطح صاف ریزنمونه به‌خوبی از عامل ضدعفونی‌کننده پاک شده‌اند و درنتیجه تمامی ریزنمونه‌های تیغه زنده مانده و تشکیل کلنی میسلیومی داده‌اند. مقایسه نتایج درصد تراریختی حاصل از آزمایشات چلوارفروش و همکاران (۷) و نتایج حاصله از آزمایش ما پیشنهاد می‌کند که پیشبر همولوگ gpdII به‌خوبی سبب بیان ژن *hph* شده و سبب ایجاد چنین اختلافی در درصد تراریزش شده است. آزمایشات قبلی نیز تأییدکننده این موضوع هستند که نوع پیشبر می‌تواند تأثیر بسزایی در درصد تراریختی داشته باشد (۸، ۴) ازآنجاکه اختلافات آزمایش صورت گرفته با آزمایشی که برنز و همکاران (۴) انجام داده‌اند سویه باکتری و پلاسمید مادری می‌باشد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد یکی از دلایل درصد پایین تراریختی، ناشی از سویه باکتری و همچنین نوع پلاسمید به‌کاررفته باشد که با نتایج حاصل از آزمایشات محقق مذکور و همچنین کارهای لیچ و همکاران (۱۵) هم‌خوانی دارد. همچنین نرخ تراریزش بافت تیغه بهتر از بافت کلاهک است لذا استفاده از بافت تیغه جهت تراریزش پیشنهاد می‌گردد. میزان مطلوب آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در آزمایش تراریزش ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد و غلظت‌های کمتر و بیشتر معمولا پاسخ مناسبی ایجاد نمی‌کنند.

منابع

1- Ashrafi M., Farsi M., Mirshamsi A, and Parvandi M. 2015. Isolation and sequence analysis of GpdΠ Promoter of the white button mushroom (*Agaricus bisporus*) from strains holland 737 and IM008. International Journal of Horticultural the Science and Technology, 2(1):33-41.

2- Bonnen A. M., Anton L. H., and Orth A. B. 1994. Lignin-Degrading Enzymes of the Commercial Button Mushroom, *Agaricus bisporus*. Apply Environ Microbiology. 60(3): 960–5.

3- Burns C., Gregory K. E., Kirby M., Cheung M. K., Riquelme M., Elliott, T. J., Challen M. P., Bailey A., and Foster G. D. 2005. Efficient GFP expression in the mushrooms Agaricus bisporus and Coprinus cinereus requires introns. Fungal Genetics and Biology, 42(3): 191-199.

4- Burns C., Leach K.M., Elliott M.P., Foster G.D., and Bailey A. 2006. Evaluation of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus* using a range of promoters linked to Hygromycin resistance. Molecular Biotechnology, 32(2): 129-138.

5- Bundock P., Dulk-Ras A.D., Beijersbergen A., and Hooykaas P.J.J. 1995. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cervisiae*. EMBO Journal, 14(13): 3206-3214.

6- Chang S., and Miles P. G. 2004. Mushrooms cultivation, Nutritional value, Medicinal effect, and environmental Impact, second edition.2nd ed. Bocaraton, CRC press.

7- Chelvarforoosh N. 2012. Optimization of the *hph* gene transfer through *Agrobacterium*- mediated in *Agaricus bisporus*. Thesis, University of Mashhad, Iran. (in Persian with English abstract)
8- Chen X., Stone M., Schanghaufer C., and Romaine P. 2000. A fruiting body tissue method for efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Agaricus bisporus*. Appl. Environmental Microbiology. 66(10): 4510-4513.
9- De Groot M. J. A., Bundock P., Hooykaas P. J. J., and Beijersbergen A. G. M. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. Nature Biotechnology, 16(9): 839-842.
10- De La Riva, G.A., J.Gonzalez-Cabrera, R. Vazquez-Pardon and C.Ayra-Pardo. 1998. *Agrobacterium tumifaciens*: A natural tool for plant transformation. Electronic Journal Biotechnology. 1(3):118-133.
11- Farsi, M, Pooriyanfar, H.R. 2012. Cultivation and Breeding of white button mushrooms. jdm Press, Mashhad, Iran. (in Persian with English abstract)
12- Hofrichter M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 30(4): 454-466.
13- Horgen P. A., and Castle A. 2002. The Application and Potential of Molecular Approaches to Mushrooms. Agricultural Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3-17.
14- Kishi K., Wariishi H., Marquez L., Dunford H.B., and Gold M.H. 1994. Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. Biochemistry, 33(29): 8694-8701.
15- Leach K., Odo V., Zhan, C., Kim H. K., Henderson K., Warner P., Challen M., and Elliott T. 2004. Progress in *Agaricus bisporus* transformation: *Agrobacterium* methodologies and development of novel marker genes. Mushroom Science. 16: 93-102.
16- Moloy S. 2004. Sugar transport and water relations of *Agaricus bisporus*. Ph.D Thesis, Cranfield University.
17- Micheielse C.B., Arentshorst M., Ram A.F., and Van, den Hondel C.A. 2005. *Agrobacterium* mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. Fungal Genetics and Biology, 42(1): 9-19.
18- Parvandi M., Farsi M., Mirshamsi A., and Ashrafi, M. 2015. Isolation and cloning of manganese peroxidase (*mnp*) gene from oyster mushroom. Journal of Agricultural Biotechnology, 2: 38-54. (in Persian with English abstract)
19- Paszczynski A., Huynh V.B., and Crawford R. 1985. Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. FEMS Microbiology Letters, 29(1-2): 37-41.
20- Romaine C.P., and Schagnhaufer C. 2006. Mushroom (*Agaricus bisporus*). Methods in Molecular Biology. Vol. 344: *Agrobacterium* Protocols, volume 2, Edited by: Kan Wang, Humana Press Inc., Totowa, NJ.
21- Sambrook J., and Russell D.W. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
22- Wariishi H., Valli K., and Gold M.H. 1992. Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators. Journal of biological chemistry, 267(33): 23688-23695.
23- Xu J. Z., Zhang J. L., Hu K. H. and Zhang W. G. 2013. The relationship between lignin peroxidase and manganese peroxidase production capacities and cultivation periods of mushrooms. Microb. Biotechnol. 6(3): 241–7.
24- Zeilinger S. 2004. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation. Current Genetics, 45(1): 54-60.

Journal of Horticultural Science
Vol. 31, No. 2, Summer 2017, P. 401-411
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶، ص.۴۱۱-۴۰۱
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Investigation on Possibility of Transferring OysterMushroom (*Pleurotusostreatus*) Manganese Peroxidase Gene (*mnp*) to the White Button Mushroom (*Agaricusbisporus*)

M. Parvandi[1]- M.Farsi[2*]- M. Ashrafi[3]

Received: 01-06-2016
Accepted: 23-11-2016

Introduction: The white button mushroom does not produce remarkable yield in the third flash. Nutritional deficiency and the inability of this mushroom to efficient use of compost are mentioned as its reasons. Basically, compost includes two major food components, lignocellulose and microbial biomass. But this microbial biomass provides just 10% of button mushroom food needs. According to research studies, differentenzymes in both white button mushroom and oyster mushroom are responsible for decomposition of lignin compounds in compost media, from begin of mycelium grows to the end of fruiting. Lacasse, manganese peroxidase, lignin peroxidase, glyoxal oxidase enzymes contribute to degradation of lignin compounds in degradation mushroom has proven by researchers however itis dependent on mushroom types. Manganese peroxidase enzyme (EC. 1.11.1.13) is an extracellular parser lignin enzyme that has a central peroxidase core. Manganese peroxidase enzyme oxidizesMn^{2+} to Mn^{3+} and then Mn^{3+} oxidizes phenolic structure to fonoxile radical. Produced Mn^{3+} is very active and makes complex by chelating organic acids that is produced by mushrooms such as oxalate or malate. Mn^{3+} ions become stable by helping of these chelates and it can penetrate through materials such as wood. On the other hand, in recent years, plant biotechnology provides new solutions for old problems such as use of microorganisms, particularly using bacteria for gene transfer and improvement of superlatives. For a sample of this method, *Agrobacterium*-mediated transformation system can be noted. In addition, the use of suitable promoters for heterologous genes expression in suitable hosts is an important strategy in functional biotechnology that has been raised in edible mushroom genetic engineering. The lack of efficient and sufficient use of compost, low power of white button mushroom in competition with other rivals, lack of yield per area unit due to production costs, pests and diseases, low flexibility and adaptability with environmental conditions changes are some of the problems that the mushroom reformers are faced. Unlike the great efforts made by researchers, conventional breeding techniques to produce the *A. bisporus* mushroom only have been led to produce a few new races. Therefore, todays some problems associated with traditional methods of breeding of edible mushrooms, including the need to provide races that have desired characteristics, the traditional method performance tests and low chances of success in the transfer of important agronomic characteristics such as functionality and disease resistance. So, they almost have been replaced with new biotechnology methods. Anexample of this method is to manipulateproperties transformation for the particular purpose. Modification of both expression or type of lignin degrading enzyme are possible solutions to deal with this problem, but these are not applicable or are difficult to be done with traditional breeding programs. In recent years, gene transformation mediated with *Agrobacterium* routinely is used for gene transformation to mushrooms and is proposed as a method for removing limitations of white button mushroom breeding.

Materials and Methods: In this research, the oyster mushroom strain Florida was used as the source of *manganese peroxidase* (*mnp*) gene and white button mushroom strain 737 gill and cap tissue were used as transformation host. *Agrobacterium* strain LBA4404 harbors p133H88-FM plasmid thatcontains*mnp* gene of oyster mushroom and also hph gene under control of gpdII promoter of the button white mushroom strain IM008 was used as a transformer. Selection medium containing 30 mg/ml Hygromycin B and was used for selecting transformed explants. To confirm transformation, PCR with specific primers of *mnp* and *hph* genes was performed on genomic DNA of selected colonies.

Results and Discussion: Results showed the gill tissue explants, with transformation rate 5%, have a better response to applied transformation method than cap tissue explants, with transformation rate zero percent. As expected, polymerase chain reaction with specific primers of*hph* and *mnp* genes amplified 1049 and 1086 bp fragments and verified the transformation of mycelium's grown on selection medium. It seems that Bacterial

1 and 2- Graduated M.Sc. and Professor in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: Mohfarsi@yahoo.com)
3- Ph.D Student in Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

strain and also used plasmid were one of the responses for observed low rate transformation which is in accordance with leach and co-workers study. Finally, we could propose that cap tissue is more suitable for further gene transformation of this mushroombecause of high transformation rate of cap tissue.

Keywords: *Agrobacterium*, Compost, Gene transformation, Lignin degradation, White button mushroom