دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد

بهینه‌سازی انتقال ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز به قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* از طریق باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس

نوید چلوارفروش

استاد راهنما

دکتر محمد فارسی

استاتید مشاور

دکتر نسرین مشتاقی

مهندس بنفشه جلال زاده

بهمن ماه 1390

دانشکده کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بهینه‌سازی انتقال ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز به قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* از طریق باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس

نوید چلوارفروش

بهمن‌ماه 1390

تصویب‌نامه

این پایان‌نامه با عنوان «بهینه‌سازی انتقال ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز به قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* از طریق باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس» توسط **نوید چلوارفروش** در تاریخ ۹۰/۱۱/۹ با نمره ۱۹/۲۶ و درجه ارزشیابی عالی درحضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	جناب آقای دکتر محمد فارسی	استاد	استاد راهنما	
۲	سرکار خانم دکتر نسرین مشتاقی	استادیار	استاد مشاور	
۳	سرکار خانم مهندس بنفشه جلال‌زاده	مربی پژوهشی جهاد دانشگاهی مشهد	استاد مشاور	
٤	جناب آقای دکتر سیدحسن مرعشی	دانشیار	استاد مدعو	
٥	جناب آقای دکتر فرج‌الله شهریاری	دانشیار	استاد مدعو	
٦	جناب آقای دکتر امین میرشمسی	استادیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

تعهد نامه

عنوان پایان‌نامه:

بهینه‌سازی انتقال ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز به قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* از طریق باکتری اگروباکتریوم تومی فاشینس

اینجانب نوید چلوارفروش دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی آقای دکتر محمد فارسی متعهد می‌شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می‌گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان‌نامه را اینجانب یا فرد دیگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تا کنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان‌نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در بدست آمدن نتایج اصلی پایان‌نامه تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافت‌های آنها برای انجام پایان‌نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

نوید چلوارفروش

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) با تولید سالیانه 5 میلیون تن، از مهم‌ترین محصولات باغبانی به شمار می‌آید. این قارچ علاوه بر نقش مهمی که در تغذیه انسان دارد، در صنعت و پزشکی نیز حائز اهمیت می‌باشد. با وجود ارزش اقتصادی بالا و اهمیت بیوتکنولوژیک این قارچ، روش‌های اصلاحی سنتی بر روی این قارچ بدلیل چرخه زندگی خاص آن و نیز به دلیل تنوع ژنتیکی پایین در بین لاین‌های تجاری آن، بسیار مشکل است. لذا در این‌گونه موارد تراریزش ژنتیکی راهگشا می‌باشد. در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن در قارچ دکمه‌ای سفید از روش تراریزش با واسطه باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس برای انتقال موثر ژن گزینشگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز (*hph*) استفاده شد. همچنین بیان ژن *gus* در نمونه‌های تراریخته مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور از دو ریزنمونه تیغه و کلاهک و دو تیمار خلاء سرمایی و گرمایی استفاده گردید. آزمون مقدماتی تحت شرایط خلاء گرمایی نشان داد که هیچ یک از ریز نمونه‌های کلاهک روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک هیگرومایسین رشد نکردند، اما تراریزش ریزنمونه‌های تیغه موفقیت‌آمیز بود و پس از آزمون PCR برای تایید حضور ژن‌های *hph* و *gus*، نرخ تراریزش در این ریزنمونه برابر با 0/33% بود. در آزمایش تکمیلی نرخ تراریزش ریزنمونه‌های تیغه پس از آزمون PCR برای ژن‌های *hph* و *gus*، به ترتیب 5/45% و 0/99% بود. در کلنی میسلیومی حاصل از ریزنمونه‌های تراریخته هیچ‌گونه تغییر رنگی پس از آزمون هیستوشیمیایی برای بررسی بیان ژن *gus* رویت نگردید. انجام آزمون RT-PCR حاکی از این بود که در ریزنمونه‌های تراریخته از روی ژن *gus*، رونویسی انجام شده و mRNA ساخته می‌شود اما منجر به تولید پروتئین نمی‌شود که دلیل آن به علت فقدان اینترون در ژن مربوطه بود.

واژگان کلیدی: قارچ دکمه‌ای سفید، انتقال ژن، ژن گزینشگر *hph*، ژن *gus*، شرایط خلاء

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه.....1

مقدمه.....1

فصل دوم: بررسی منابع 7

2-1. تاریخچه پرورش قارچ دکمه‌ای سفید.....7

2-2. رده‌بندی علمی و اندام شناسی قارچ دکمه‌ای 7

2-3. جایگاه قارچ‌های خوراکی در دنیای امروز 9

2-4. اهمیت تغذیه‌ای قارچ‌های خوراکی.....10

2-4-1. محتوای پروتئین.....10

2-4-2. ویتامین‌ها.....11

2-4-3. مواد معدنی.....11

2-4-4. چربی‌ها.....12

2-4-5. کربوهیدرات و فیبر.....12

2-4-6. محتوای رطوبتی.....13

2-5. چرخه زندگی در قارچ دکمه‌ای سفید.....13

2-5-1. الگوی چرخه زندگی در جمعیت‌های هموتال ثانویه قارچ دکمه‌ای 13

2-6. موانع موجود در راه اصلاح قارچ دکمه‌ای سفید.....15

2-7. انتقال ژن 16

2-7-1. انتقال ژن با استفاده از آگروباکتریوم.....17

2-7-1-1. اساس مولکولی انتقال ژن به وسیله آگروباکتریوم تومی‌فاشینس.....19

2-7-1-2. انتقال T-DNA.....21

2-7-1-3. روش‌های تراریزش با استفاده از آگروباکتریوم.....23

2-7-1-3-1. آلوده‌سازی گیاهان زخمی.....23

2-7-1-3-2. کشت توأم.....24

2-7-1-3-3. روش دیسک برگی.....24

2-7-2. ناقلین جفتی یا دوتایی.....25

2-7-2-1. ناقلین pCAMBIA.....26

2-7-3. پیشبرنده و توالی تنظیم کننده DNA.....28

2-8. ژن‌های نشانگر.....29

2-8-1. ژن‌های گزارشگر.....29

2-8-1-1. ژن گزارشگر بتا گلوکورونیداز یا *gus*.....30

2-8-2. نشانگر گزینشگر.....30

2-8-2-1. ژن گزینشگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز.....31

2-9. انتقال ژن به قارچ‌ها.....31

2-9-1. انتقال ژن گزینشگر هیگرومایسین فسفوترانسفراز به قارچ دکمه‌ای سفید.....32

2-9-2. انتقال ژن‌های گزارشگر به قارچ دکمه‌ای سفید.....36

2-9-3. اهداف انتقال ژن به قارچ دکمه‌ای سفید.....36

2- 9-3-1. تولید پروتئین‌های هترولوگ انسانی.....37

فصل سوم: مواد و روش‌ها.....39

3-1. مواد شیمیایی 39

2-3. باکتری‌ها 39
3-3. ناقل 39
4-3. تهیه ریزنمونه 40
5-3. محیط کشت‌ها 41
1-5-3. محیط کشت باکتریایی LB 41
2-5-3. محیط کشت‌ها جهت انتقال ژن 42
1-2-5-3. محیط کشت حداقل(MM) 42
2-2-5-3. محیط کشت القائی (IM) 42
3-2-5-3. محیط کشت هم‌کشتی(CCM) 42
4-2-5-3. محیط کشت انتخابی (SM) 43
5-2-5-3. مالت آگار(MA) 43
6-3. شرایط دمایی پمپ خلاء 43
7-3. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده 44
8-3. تعیین غلظت آستانه تاثیر هیگرومایسین 45
9-3- آغازگرها 46
1-9-3- آغازگر رفت و برگشت ژن *hph* 46
2-9-3- آغازگر رفت و برگشت ژن *gus* 46
10-3. استخراج پلاسمید به روش Mini – Preparation 47
11-3. انتقال ناقل PCAMBIA1304 حامل ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز به آگروباکتریوم 49
12-3. اثبات وجود ناقل در آگروباکتریوم با استفاده از تکنیک Colony PCR 50

13-3. مراحل تراریزش قارچ دکمه‌ای سفید توسط باکتری آگروباکتریوم.....51

1-13-3. کشت و آماده‌سازی باکتری آگروباکتریوم.....51

2-13-3. آماده نمودن ریز نمونه‌ها 52

3-13-3. هم کشتی قارچ دکمه‌ای و باکتری آگروباکتریوم 52

4-13-3. انتخاب قارچ‌های تراریخته.....53

14-3. استخراج DNA از قارچ دکمه‌ای و بررسی کمی و کیفی آن.....54

1-14-3. استخراج DNA.....54

2-14-3. بررسی کمی DNA.....55

3-14-3. بررسی کیفی DNA توسط الکتروفورز ژل آگارز 55

15-3. تایید تراریزش کلنی‌های رشد یافته با استفاده از آزمون PCR.....55

1-15-3. تایید تراریزش با استفاده از آغازگرهای ژن *hph*.....55

2-15-3. تایید تراریختی با استفاده از آغازگرهای ژن*gus*.....56

16-3.آزمون هیستوشیمیایی ژن *gus*.....56

17-3. استخراج RNA و RT-PCR.....58

فصل چهارم: نتایج وبحث.....59

1-4.ضدعفونی‌کردن ریزنمونه‌ها.....59

2-4. تعیین غلظت آستانه هیگرومایسین.....60

3-4. آزمون زنده‌مانی ریزنمونه‌ها در شرایط خلا سرمایی.....61

4-4. استخراج پلاسمید و انتقال به باکتری آگروباکتریوم تومی‌فاشینس.....62

5-4. تراریزش ریزنمونه‌های کلاهک و تیغه با غلظت‌های مختلف باکتری در شرایط خلا گرمایی.....63

6-4. تایید ریزنمونه تراریخته با استفاده از آزمون PCR.....64

7-4. آزمون هیستوشیمیایی جهت بررسی بیان ژن*gus* در میسلیوم حاصل از ریزنمونه تیغه تراریخته.....65

8-4. تراریزش ریزنمونه‌های تیغه در شرایط خلای سرمایی و گرمایی.....66

9-4. تایید تراریختی ریزنمونه‌های رشد یافته حاصل از تیمار خلا سرمایی و گرمایی با استفاده از آزمون PCR و انجام آزمون هیستوشیمیایی.....67

10-4. انجام آزمون RT-PCR جهت تایید بیان ژن‌های *gus* و *hph* و تایید عدم آلودگی با آگروباکتریوم.....69

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات 71

نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات 71

فصل ششم: منابع 73

منابع 73

فهرست شکل‌ها

شکل 2-1- نقشه شماتیک ناقل Ti 18

شکل 2-2. نحوه آلوده شدن سلول گیاهی توسط آگروباکتریوم 23

شکل2-3- تقشه ساختار عمومی ناقل‌های خانواده pCAMBIA 27

شکل3-1: نقشه ناقل بیان گیاهی pCAMBIA1304 40

شکل 3-2. برش قارچ دکمه‌ای سفید و تهیه ریزنمونه‌ها 41

شکل 3-3: چگونگی ایجاد شرایط خلاء سرمایی 44

شکل 4-1. درصد آلودگی ریزنمونه‌های تیغه و کلاهک در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم 60

شکل 4-2. زنده ماندن ریزنمونه‌ها در شرایط خلا سرمایی به روی محیط مالت آگار 61

شکل 4-3. قطعه‌های 348 و 1098 جفت بازی مربوط به ژن‌های *hph* و *gus* 62

شکل 4-4. کلونی میسلیومی حاصل از ریزنمونه تیغه مشکوک به تراریخت بودن در محیط کشت CYM مایع 63

شکل 4-4. بررسی و آزمایش DNAی استخراج شده از کلنی میسلیومی حاصل از ریز نمونه تراریخته و شاهد 65

شکل 4-5. عدم ظهور رنگ آبی در میسلیوم‌های حاصل ار از ریزنمونه تراریخته پس از آزمون هیستوشیمیایی 66

شکل 4-6. رشد ریزنمونه‌های تیغه تیمار شده با خلای سرمایی بر روی محیط کشت انتخابی حاوی 30 میلی گرم در لیتر هیگرومایسین 68

شکل 4-7. بررسی و آزمایش RNAی استخراج شده از ریزنمونه‌های رشده یافته بر روی محیط انتخابی و شاهد با استفاده از تکنیک RT-PCR و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *gus* و *hph* 70

فهرست جدول‌ها

جدول 2-1. مقایسه پیشبرنده‌های مختلف در میزان تراریزش قارچ دکمه‌ای سفید 34

جدول 3-1. غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد نیاز در محیط‌های کشت 45

جدول 3-2. اجزای مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تایید حضور ژن *hph* در قارچ دکمه‌ای سفید 56

جدول 3-3. ترکیبات مرحله اول واکنش ساخت رشته اول cDNA 58

جدول 3-4. ترکیبات مرحله دوم واکنش ساخت رشته اول cDNA 58

جدول 4-1. درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های تیغه و کلاهک در محیط کشت انتخابی با غلظت‌های مختلف هیگرومایسن 61

فهرست علائم و اختصارا

نام اختصاری	معادل انگلیسی یا نام کامل انگلیسی	معادل فارسی
CCM	Co Culture Medium	محیط هم کشتی
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	EDTA
hph	Hygromycin phosphotransferase	هیگرومایسین فسفوترانسفراز
LB	Loria Bertani	LB
IM	*Induction* Medium	محیط کشت القائی
MA	Malt Agar	مالت آگار
MM	Minimal Medium	محیط کشت حداقل
SDS	*Sodium* dodecyl sulfate	SDS
SM	Selective Medium	محیط کشت انتخابی

فصل اول

مقدمه

افزایش روز افزون جمعیت و نیاز به مواد غذایی متنوع و با کیفیت غذایی بالا سبب شده تا تولید محصولاتی که دارای پروتئین و املاح مناسبی هستند و امکان افزایش تولید آنها در کشور وجود دارد، مورد توجه بیشتری قرار بگیرند. از سوی دیگر محدودیت زمین‌های قابل کشت برای محصولات کشاورزی رایج، سبب شده است که تولید غذا از طریق منابع جایگزین مانند قارچ‌ها بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. قارچ‌های خوراکی یکی از ارزشمندترین و ارزان‌ترین منابع پروتئینی محسوب می‌شوند و در جهان از اهمیت فراوانی برخوردار می‌باشند. ارزش غذایی این قارچ‌های خوراکی از سال 1940 به بعد، یعنی زمان بروز کمبود مواد غذایی در اثر جنگ جهانی دوم، مورد توجه قرار گرفت و از سال 1960 به بعد تحقیقات زیادی در رابطه با پروتئین انواع قارچ‌های خوراکی صورت گرفته است (خاتمی راد، 1385).

ترکیبات به دست آمده از برخی قارچ‌های خوراکی- دارویی در درمان بیماری‌های مهمی همچون سرطان و ایدز کاربرد دارند. این ترکیبات که قدمتی بسیار طولانی دارند هم اکنون از جذابیت زیادی در نزد محافل علمی و پژوهشی برخوردار می‌باشند (فارسی و گردان، 1386). امروزه قارچ‌های خوراکی به جایگاهی

رسیده‌اند که در سال 1994 از سوی اتحادیه غذا و داروی آمریکا[1] به عنوان غذای تندرستی معرفی شدند (محمدی گل تپه و پورجم، 1379).

حدود 5000 گونه مختلف قارچ وجود دارد که از این تعداد حداقل 1225 گونه خوراکی گزارش شده است. قارچ‌ها علاوه بر دارا بودن انواع متفاوتی از پروتئین‌ها منبع غنی از ویتامین‌ها نیز می‌باشند و همین امر سبب گردیده استفاده از قارچ به عنوان یک منبع غذایی کامل، جایگاه خاصی در سبد غذایی مردم اکثر کشور های جهان داشته باشد (خاتمی راد، 1385).

در میان قارچ‌های خوراکی، قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) با تولید سالیانه 5 میلیون تن (به ارزش بیش از سه میلیارد پوند) از مهم‌ترین محصولات باغبانی به شمار می‌آید. این محصول روی کمپوست حاصل از فضولات دام و کاه و کلش باقیمانده از محصولات کشاورزی رشد می‌کند و به این ترتیب نقش موثری در بازیافت آنها ایفاء می‌کند و بعلاوه کمپوست مصرف شده نیز برای بهبود خاک قابل استفاده خواهد بود. قارچ دکمه‌ای سفید نقش مهمی در صنعت و پزشکی دارد و طیف وسیع و متنوعی از آنزیم‌ها همچون لیپازها[2] و پروتئازها[3] و نیز متابولیت‌های اولیه شامل اسیدهای آلی را از خود ترشح می‌کند. موادی مانند آنتی-بیوتیک پنی‌سیلین[4] و سفالوسپورین[5]، که جزء متابولیت‌های ثانویه هستند را می‌توان از این قارچ استخراج کرد و مورد استفاده قرار داد. همچنین این قارچ به عنوان تجزیه کننده اولیه بر روی مواد و میزبان‌های طبیعی نقش مهمی ایفاء می‌کند (دوگروت و همکاران، 1998). به دلیل شباهت سیستم گلیکوزیلاسیون[6] قارچ دکمه‌ای سفید

[1]- FDA
[2] - Lipase
[3] - Protease
[4] - Penicillin
[5] - Sephalosporin
[6] - Glycosylation

و سلول پستانداران، این قارچ به عنوان کارخانه زیستی تولید کننده پروتئین‌های هترولوگ مورد استفاده قرار می‌گیرد و در سال‌های اخیر به عنوان یک منبع مهم تولید دارو به شمار می‌آید (برنز و همکاران، 2006).

با وجود ارزش اقتصادی بالا و اهمیت بیوتکنولوژیک، تکنولوژی‌های مورد نیاز برای به کارگیری این پتانسیل‌ها رشد کندی داشته‌اند. در میان قارچ‌های خوراکی، کار اصلاحی بر روی قارچ دکمه‌ای سفید از همه مشکل‌تر بوده که این مشکل غالباً ناشی از چرخه زندگی و زیست‌شناسی خاص این گونه است که در واقع همان هموتالیسم ثانویه می‌باشد. در این نوع زندگی، یک اسپور که خود حاوی دو هسته متفاوت و سازگار است می‌تواند یک شبکه میسلیومی خود بارور تولید کند (فارسی و گردان، 1386). همچنین اصلاح نژاد در این موجود به دلیل تنوع ژنتیکی پایین در بین لاین‌های تجاری، راندمان چندانی ندارد (فان و همکاران، 2006). در اینگونه موارد یکی از راه‌های جایگزین روش‌های سنتی اصلاح نژاد، استفاده از روش تراریزش ژنتیکی یا انتقال ژن می‌باشد. در حقیقت انتقال ژن فرایندی است که قطعه مشخصی از DNA (معمولاً یک ژن خارجی وارد شده در پلاسمید باکتریایی) را به درون سلول‌ها وارد می‌نماید. تراریزش[7] ژنتیکی تکنولوژی قدرتمندی است که از طریق آن ژن‌ها می‌توانند در داخل یا بین جنس‌های مختلف انتقال داده شوند. همچنین تراریزش پیش‌نیازی برای تعیین کارکرد ژن‌ها و پایه تحلیل‌های زیست‌شناسی می‌باشد. تراریزش می‌تواند بطور مستقیم از طریق اضافه-کردن ژن‌های جدید یا تغییر بیان ژن‌های موجود باعث بهبود نژادها شود (لیچ وهمکاران، 2004). در اصلاح نباتات، تکنیک‌های مرتبط با انتقال ژن از طریق تکثیر جنسی و رویشی رایج می‌باشند. هدف از این تکنیک‌ها ایجاد تنوع ژنتیکی در جوامع گیاهی، انتخاب گیاهان برتر از نظر ژن‌های کنترل‌کننده صفات مطلوب و همچنین حفظ تنوع واریته‌های گیاهی می‌باشد. با استفاده از تکنیک‌های اصلاحی مرسوم، پیشرفت‌های چشم‌گیری در

[7] - Transformation

زمینه بهبود عملکرد گیاهان زراعی حاصل شده است، اما این تکنیک‌ها وقت‌گیر هستند (چن و همکاران، 2000).

در سال‌های اخیر، بیوتکنولوژی گیاهی برای رفع مشکلات قدیمی راه‌حل‌های نوینی فراهم کرده است که می‌توان به کاربرد میکروارگانیسم‌ها خصوصاً باکتری‌ها جهت انتقال ژن و بهبود صفات عالی نام برد (چن و همکاران، 2000).

اگروباکتریوم تومی‌فاشینس (*Agrobacterium tumefaciens*) یک باکتری خاکزی می‌باشد که طیف وسیعی از گیاهان را تراریخته می‌کند و نقش مهمی در مهندسی ژنتیک و بیولوژی مولکولی ایفاء می‌کند. در ابتدا اعتقاد بر این بود که این باکتری فقط توانایی تراریخته نمودن دولپه‌ای‌ها و تعدادی از تک لپه‌ای‌ها را دارد، اما تحقیقات بعدی خلاف این نظریه را اثبات کرد، چرا که گروهی از گونه‌های سخت که میزبان طبیعی این باکتری نبودند توسط باکتری فوق تراریخته شدند، از جمله این گونه‌ها می‌توان قارچ‌های رشته‌ای[8] را نام برد (باندوک و همکاران، 1995؛ شارما و کوهاد، 2010).

در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی انتقال ژن در قارچ خوراکی سفید از روش تراریزش با واسطه اگروباکتریوم برای انتقال موثر ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز[9] (*hph*) که از جمله ژن‌های نشانگر گزینشگر می‌باشد، استفاده شده است. این ژن از باکتری *E. coli* بدست آمده است. هیگرومایسین B[10] یک آنتی بیوتیک آمینوسیکلیتول[11] است که در سنتز پروتئین تداخل ایجاد می‌کند. این آنتی بیوتیک بسیار سمی‌تر از کانامایسین[12] بوده و سلول‌های حساس را سریعتر می‌کشد. در واقع وجود ژن هیگرومایسین فسفوترانسفراز سلول‌های

[8] - Filamentous fungi
[9] - Hygromycin phosphotransferase
[10] - Hygromycin B
[11] - Aminocyclitol
[12] - Kanamycin

تراریخته را از قابلیت زنده ماندن در محیط کشت‌هایی که محتوی مقادیر کشنده از عامل گزینش که همان هیگرومایسین B می‌باشند، برخوردار می‌سازد، در حالی که سلول‌های غیرتراریخته در چنین محیط‌هایی از بین می روند (فارسی و ذوالعلی، 1387).

هدف از انجام این طرح بهینه‌سازی سیستم انتقال ژن با کمک آگروباکتریوم و تولید آزمایشی لاین تراریخته در قارچ دکمه‌ای سفید می‌باشد. انتظار می‌رود با فراهم شدن این امکان و انجام مطالعات پیشرفته‌تر در شناسایی و جداسازی ژن‌های کلیدی کنترل کننده صفات مطلوب در این قارچ، در آینده‌ای نزدیک بتوان از طریق دستورزی‌های هدفمند و کنترل شده، نژادهایی با خصوصیات ویژه و برتر تولید کرد.

فصل دوم

بررسی منابع

2-1. تاریخچه پرورش قارچ دکمه‌ای سفید

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید رایج‌ترین قارچی است که در سراسر دنیا کشت می‌شود. این قارچ در حدود سال 1650 میلادی در حومه پاریس کشت می‌شده است. به تدریج در قرن 18 کشت این قارچ در تمام اروپا گسترش یافت. گسترش تولید قارچ دکمه‌ای سفید در اواخر قرن 19، به آمریکا رسید و از سال 1910 کشت و تولید آن در خانه و محیط‌های کنترل شده رواج پیدا کرد. از دهه 1960، توسعه صنعت تولید و پرورش قارچ‌های خوراکی و به ویژه قارچ دکمه‌ای سفید به شیوه مدرن آغاز شد و با تاسیس آزمایشگاه‌های تحقیقاتی در اروپا و آمریکا، فناوری تولید و پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید پا به عرصه جدیدی گذاشت. اکنون در بسیاری از کشورهای پیشرفته، پرورش این نوع قارچ به عنوان یک صنعت سودآور شناخته می‌شود (فارسی و گردان، 1386).

2-2. رده‌بندی علمی و اندام شناسی قارچ دکمه‌ای

در گذشته‌ی دور، قارچ‌ها به علت داشتن دیواره سلولی و اسپور[13] جز سلسله گیاهان طبقه‌بندی می‌شدند، اما بعدها مشخص شد از آنجایی که قارچ‌ها فاقد کلروفیل بوده و متکی به وجود مواد آلی هستند، به

[13] - Spore