Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال یازدهم ـ شماره دوم ـ تابستان ۱۳۸۳
www.magiran.com/jasnr

اصلاح عملکرد قارچ خوراکی دگمه‌ای سفید با استفاده از گزینش جدایه‌های خالص و کشتهای چند اسپوری

حمید رضا گردان[1] و محمد فارسی[2]

[1]گروه پژوهشی بیوتکنولوژی کشاورزی جهاد دانشگاهی مشهد، [2]گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۱/۶/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۲/۱۲/۱۳

چکیده

اصلاح قارچ خوراکی دگمه‌ای سفید همواره با مشکلات زیادی همراه بوده است. هموتالیسم ثانویه در این قارچ باعث می‌شود که بیشتر بازیدیوسپورها (بیش از ۹۰درصد)، هتروکاریونهای خودبارور تولید کنند و فراوانی هموکاریونها که از نظر اصلاحی مهم هستند، بسیار پایین (کمتر از ۱۰درصد) باشد. هدف اصلی این مطالعه، استفاده از تنوع موجود در میان جدایه‌های خالص و نمونه‌های گرفته شده از کشت‌های چند اسپوری در جهت به نژادی این قارچ بود. کشتهای اسپوری از چندین نژاد تجاری خارجی و داخلی تهیه شدند. از کشتهای تک و چند اسپوری، جدایه‌های خالص تهیه شدند و برای تولید بذر و اندام زایشی مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس شکل پرگنه و سرعت رشدی، تنوع بازیدیوسپورها در محیط کشت جامد، بذر و بستر کشت مورد آزمون قرار گرفت. سپس ارتباط بین کلاسهای شکل پرگنه، سرعت رشدی و عملکرد بررسی شد. نتایج نشان داد که هیچکدام از جدایه‌های دارای تیپ رشدی بدون میسلیوم هوایی و سرعت رشدی کند یا بسیار کند، قارچی تولید نکردند یا تولید آنها بسیار اندک ($\leq$۳ kg/m^2) بود، اما در غالب جدایه‌های دارای تیپ رشدی رشته‌ای و سرعت رشدی سریع، عملکرد متوسط و بالا (۱۰-۳ kg/m^2) یا بسیار بالا ($\geq$۱۰ kg/m^2) مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: اصلاح، آگاریکوس بایسپوروس، سرعت رشدی، شکل پرگنه، گزینش

مقدمه

در اوایل دهه ۱۹۷۰ بژاگ انجام یکسری تحقیقات مستمر رفتار ویژه قارچ دگمه‌ای سفید، *Agaricus bisporus* در طی چرخهٔ زندگی کشف و مشخص شد (میلر[1]،۱۹۷۱؛ الیوت[2]،۱۹۷۲ و ریپر و همکاران[3]،۱۹۷۲) که این قارچ یک هموتال ثانویه است آنچه که امروز ترجیحاً طبق نظر کریگان (۱۹۹۰) آن را به‌عنوان انترامیکتیک می‌شناسیم. در وضعیت انترامیکتیک، هر کدام از سلولهای بازیدیوم دیکاریون (n+n) تبدیل به یک دیپلوئید ناپایدار (۲n) شده و بلافاصله در اثر تقسیم میوز چهار هسته هاپلوئید n کروموزمی تولید می‌کند. به‌طریقی غیرتصادفی در بیش از ۹۰ درصد از موارد، دو هسته هاپلوئید غیرخواهری که از نظر ژن تیپ آمیزشی مخالف یکدیگرند، وارد یک بازیدیوسپور می‌شوند. هر بازیدیوسپور می‌تواند تولید هیف و در نهایت میسلیوم نماید. در رشته میسلیوم جدید، واحدهای سلولی چند هسته‌ای بوده و از هر کدام از دو هسته غیرخواهری چندین نسخه متفاوت دارند. این هسته‌ها تا هنگام تشکیل اندام‌زایشی با هم جفت نشده و مهاجرت نمی‌کنند. این

1- Miller
2- Elliot
3- Raper et al.

www.SID.ir

Archive of SID

مشخصات در طی آزمایشهای متعدد توسط محققین گزارش شده است (کریگان و همکاران[1]،۱۹۹۳؛ خوش و همکاران[2]، ۱۹۹۵؛ میلز و چانگ[3]، ۱۹۹۷). در این وضعیت به میسلیوم اصطلاحاً هتروکاریون خودبارور می‌گویند. از طرف دیگر در کمتر از ده درصد از موارد، بازیدیوسپورهایی به وجود می‌آیند که دارای یک هسته هاپلوئید می‌باشند و یا با فراوانی بسیار کمتری ممکن است دو هسته هاپلوئید خواهری وارد یک بازیدیوسپور شوند که در هر دو حالت، یک میسلیوم هموکاریون خود عقیم به‌وجود می‌آید. در این وضعیت نیز میسلیوم چند هسته‌ای است ولی همه از یک نوع هسته هاپلوئید می‌باشند. تعداد بازیدیوسپوری که هر بازیدیوم تولید می‌کند، تحت کنترل ژنی[4] است که با ژن تیپ آمیزشی پیوسته بوده و هر دو روی کروموزم شماره یک قرار دارند (کریگان[5]، ۲۰۰۰).

میسلیوم هموکاریوتیک خود عقیم است اما اگر در تلاقی با میسلیوم هموکاریوتیک سازگار دیگری (سازگاری به مفهوم مخالف بودن تیپ آمیزشی) قرار گیرد، ممکن است یک میسلیوم هتروکاریوتیک خود بارور به وجود آید. هموکاریونها در برنامه‌های به نژادی حایز اهمیت هستند، زیرا می‌توان ژنهای مطلوب دو نژاد را در یک هیبرید جمع کرده و از خاصیت هتروزیس در بهبود صفات استفاده نمود. بنابراین شاخص‌های دقیقی برای شناخت هموکاریونها و هتروکاریونها وجود ندارد (برای مثال، ارتباطات کلامپ[6] که شاخص مناسبی برای هتروکاریونی بودن یک رشته میسلیوم است، در جنس آگاریکوس مشاهده نمی‌شود). روشهای آزمون میوه‌دهی و سرعت رشد پرگنه که بطور سنتی در تشخیص هموکاریونها به کار می‌رود، سخت، زمان بر و دارای دقت پایینی هستند (هورگن و اندرسون[7]،۱۹۹۲؛ کریگان و همکاران، ۱۹۹۲؛ مهتا و بهندال[8]، ۱۹۹٤؛ اوفتوس و همکاران[9]، ۱۹۹۵). تندش آهسته و ناهماهنگ بازیدیوسپورها از دیگر مشکلات به نژادی در این قارچ است. علاوه بر آن کشت بازیدیوسپورها با مشکل آلوده شدن توسط باکتریها روبرو است (به ویژه بنابر گزارش کار هورگن و همکاران[10]، ۱۹۸۹).

دو روش مهم اصلاحی در این قارچ یکی آمیزش هموکاریونها از دو نژاد متفاوت برای دستیابی به هیبریدهای درون گونه‌ای و دیگری گزینش از درون یک نژاد با استفاده از تنوع بازیدیوسپورها می‌باشد (که بطور کامل در کارهای کستل و همکاران[11]، ۱۹۹۸؛ پندی و تواری[12]، ۱۹۹٤؛ پاتک و همکاران[13]، ۱۹۹۸؛ هورگن و کستل، ۲۰۰۲؛ در مورد آن مفصلاً بحث شده است). روش اول در ایران برای اولین‌بار در طی یک تحقیق انجام شد و با موفقیتهای نسبتاً امید بخشی همراه بود (فارسی و گردان، ۱۳۸۱). روش دوم شامل گزینش براساس تنوعی است که بازیدیوسپورها در جدایه‌های خالص (گرفته شده از کشت‌های تک‌اسپوری) یا کشت‌های چند اسپوری نشان می‌دهند. در این مطالعه از روش دوم به منظور گزینش جدایه‌های با عملکرد بالا استفاده شد.

مواد و روشها

نژاد: نژادهای مورد استفاده عبارت بودند از: نژادهای تجاری A15 و ۱۳۰ (هر دو از نژادهای هیبرید U3 و مورد کشت در ایران هستند که از قارچ کاران کشور دریافت شدند، نژادهای گرفته شده از هیبرید سفید U3 شامل MC370، MC371 و MC395 و نژادهای گرفته شده از هیبرید کرم U1 شامل MC377، MC378 و MC392 که این ٦ نژاد همگی از آزمایشگاه قارچهای خوراکی دانشگاه ایالتی پنسیلوانیای آمریکا دریافت شدند.

1- Kerrigan et al.
2- Khush et al.
3- Miles & Chang
4- BSN (basidial spore number)
5- Kerrigan
2- Clamp connections
7- Horgen & Anderson

8- Mehta and Bhandel
9- Loftus et al.
10- Horgen et al.
11- Pandey and Tewari
12- Horgen and Castle
13- Pathak et al.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه بازیدیوسپورها: یک عدد قارچ متوسط تازه که هنوز در بستر کشت بوده و پرده زیر کلاهک آن به شدت کشیده شده بود، انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی کلاهک، پایه و پرده زیر کلاهک قطع شد. کلاهک روی کاغذ صافی سترون در یک نیم ظرف پتری سترون قرار گرفته و یک بشر سترون بر روی آنها قرار گرفت. پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت نقش اسپور فاقد آلودگی بر روی کاغذ صافی نقش بست (فارسی و گردان، ۱۳۸۱).

کشت و تندش بازیدیوسپورها: یک مایع تعلیقی غلیظ از اسپورها تهیه و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم یک درصد، با آب دو بار تقطیر سترون، شستشو انجام شد. با استفاده از یک لام گلبول شمار، تراکم اسپورها به اندازه 10×8 اسپور بر میلی‌لیتر تنظیم و ۱۸۷/۵ میکرولیتر از آن (شامل حدود ۱۵،۰۰۰ اسپور) به هر ظرف پتری محتوی *محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار* یا *محیط کشت کامل عصاره مخمر آگار*، منتقل شد. برای به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی از استرپتومایسین به میزان ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. سپس کشت بافت ده روزه میسلیوم یکی از نژادهای قارچ دگمه‌ای سفید روی نیم ظرف پتری کشت اسپور قرار گرفت و دو نیم ظرف با پارافین به هم متصل شدند. ظروف به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (طبق روش کوکوروویچ و هورگن[1]، ۱۹۹۴). کشتها به دو گروه *الف* و *ب* به‌ترتیب برای بدست آوردن کشت تک اسپور و چند اسپور تقسیم شدند.

تهیه تک اسپورها: در کشت‌های گروه الف، اجازه داده شد تا پرگنه هر کدام از اسپورها تا حد قابل مشاهده رشد نماید. محل تشکیل پرگنه‌هایی که رشد کرده بودند، علامت‌گذاری شده و در زیر هود استریل، هر پرگنه منفرد به محیط کشت تازه منتقل شد (طبق روش پاتاک و همکاران، ۱۹۹۸). کشت‌ها به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت ۱± ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از این کشت‌ها برای تهیه بذر استفاده شد.

تهیه کشت چند اسپوری: در کشت‌های گروه ب، اجازه داده شد تا پرگنه اسپورها به طرف همدیگر رشد کرده و سطح ظرف پتری را بپوشانند پس از به هم رسیدن پرگنه اسپورها، هر کشت از نظر شکل پرگنه و سرعت رشدی به چند ناحیه تقسیم و از هر ناحیه نمونه‌ای به محیط کشت تازه منتقل شد. به منظور رشد کامل میسلیوم، کشت‌ها به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت ۱ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از این کشت‌ها برای تهیه بذر استفاده شد.

تهیه بذر: یک کیلوگرم دانه گندم تازه در یک و نیم لیتر آب به مدت ۱۵ دقیقه جوشانیده شد. سپس دانه‌های گندم در داخل آب گرم به مدت ده دقیقه باقی ماندند (فارسی و گردان، ۱۳۸۱). بعد از سرد شدن دانه‌های گندم و حذف آب اضافی آنها، ۶ گرم سولفات کلسیم هیدراته و ۱۲ گرم کربنات کلسیم به آنها اضافه و از این مخلوط حدود ۱۰۰ گرم به ظروف ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شدند. ظروف حاضر، به مدت ۴۵ دقیقه در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتی‌گرد اتوکلاو شدند. به منظور تلقیح، یک قطعه از کشت به قطر تقریبی دو سانتی متر، در دانه‌های گندم قرار داده شد. ظروف به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون میوه‌دهی: فرآیند کمپوست‌سازی و پاستوریزاسیون طبق روش مرسوم در ایران (۳) انجام شد. پنج کیلوگرم کمپوست در کیسه‌های پلاستیک ده کیلویی ریخته و سپس مایه زنی انجام شد. کیسه‌ها به صورت کاملاً تصادفی در ارتفاع ۳۰ سانتی‌متری کف اتاق قرارداده شدند. گسترش شبکه میسلیومی در بستر کشت در درجه حرارت ۱±۲۳ درجه‌سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد انجام شد. خاک‌دهی، هوادهی و ایجاد شرایط برای تبدیل مرحله رویشی به زایشی مطابق روش مرسوم در ایران انجام گرفت (گردان، ۱۳۷۹). برداشت به مدت یک ماه در طی چهار تناوب انجام شد. یادداشت برداری روزانه از تمام کیسه‌ها جهت بررسی میزان و چگونگی تولید اندامهای میوه‌دهی هر جدایه انجام شد. هنگامی که

1- Kokorwicz et al.

www.SID.ir

Archive of SID

اندام میوه‌دهی به بلوغ رسیدند ولی قبل از اینکه پرده زیر کلاهک باز شود، بررسی تنوع جدایه‌ها از نظر وزن و برخی صفات اصلاحی دیگر انجام شد. گزینش نهایی براساس ارتباط شکل پرگنه و سرعت رشدی در محیط کشت جامد و بذر با عملکرد آنها در آزمون میوه‌دهی انجام پذیرفت.

بررسی صفات اصلاحی: چندین صفت اصلاحی مورد بررسی قرار گرفت که یکی از آنها نسبت قطر کلاهک به ارتفاع پایه بود. این نسبت در جدایه‌های مختلف تک اسپوری اندازه‌گیری شد. این نسبت هر چه بالاتر باشد، بیانگر میزان بالای بازار پسندی و مرغوبیت این قارچ است. این اندازه‌گیری‌ها در زمانی انجام شد که پرده زیر کلاهک به شدت کشیده شده اما هنوز باز نشده بود (۳).

نتایج و بحث

تندش بازیدیوسپورها: در گروه الف، پنج روز پس از کشت اسپور، با مشاهدات میکروسکوپی (بزرگنمایی ۱۰ عدسی شیئی)، تندش بازیدیوسپورها قابل رؤیت بود. در بیشتر نژادها، سرعت تشکیل پرگنه‌ها در روزهای ۱۲-۵ سریعتر بود (شکل۱) و علاوه بر آن بازیدیوسپورها در محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار بهتر از محیط کشت کامل عصاره مخمر آگار تندش نمودند. در غالب موارد پس از ۱۲ روز پرگنه هر کدام از این اسپورها با چشم غیر مسلح به وضوح مشاهده می‌شد. در این حالت امکان انتقال هر کدام از این پرگنه‌ها به محیط کشت تازه وجود داشت. اصولاً انتقال پرگنه بسیار ساده تر از انتقال بازیدیوسپوری است که در آغاز تشکیل لوله تندش خود قرار دارد، زیرا پرگنه به سادگی با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است و انتقال آن به سادگی توسط یک سوزن نوک پهن امکان‌پذیر است. البته بایستی فواصل اسپورها از همدیگر طوری باشد که پرگنه آنها در هنگام انتقال با هم تداخل نداشته باشند. هنگامی که تراکم مناسب از اسپورها انتخاب شود و محلول اسپور به‌طور یکنواخت در روی محیط کشت ریخته شود، فاصله مناسب اسپورها از همدیگر بدست می‌آید. با استفاده از میکروسکوپ، ابتدا تندش تک اسپورها مشخص و از پشت ظرف پتری علامت گذاری شد. پس از چند روز پرگنه حاصل رشد کرده و به پتری دیش جدید منتقل گردید. در گروه ب، ظرف ۱۵ روز پس از کشت اسپور، پرگنه بازیدیوسپورها به طرف همدیگر رشد کرده و سراسر محیط کشت را اشغال کردند. در این حالت امکان نمونه برداری از نواحی مختلف کشت وجود داشت.

تنوع در میان جدایه‌های خالص: ۲۵-۲۰ روز پس از انتقال تک اسپورها (پرگنه‌های منفرد)، شبکه میسلیوم هر تک اسپور به قدر کافی محیط کشت را اشغال کرد و آماده تهیه بذر شد. این کشتها در واقع جدایه‌های خالص بودند، زیرا هر یک از یک بازیدیوسپور گرفته شده بودند. تنوع در میان این جدایه‌های خالص، به صورت تیپهای مختلف رشدی میسلیوم قابل مشاهده بود. هر جدایه بر اساس شکل پرگنه و سرعت رشدی مورد بررسی قرار گرفت. از نظر شکل پرگنه انواع رشته‌ای، کرکی، پنبه‌ای بدون میسلیوم هوایی و از نظر سرعت رشدی انواع سریع، کند و بسیار کند قابل تشخیص بودند (شکل ۲). شکل میکروسکوپی میسلیوم و برخی شاخص‌های مورفولوژیکی نیز در بین جدایه‌های خالص متفاوت بود (لی و همکاران[1]، ۱۹۹٤؛ هیس و همکاران[2]، ۱۹۹۵).

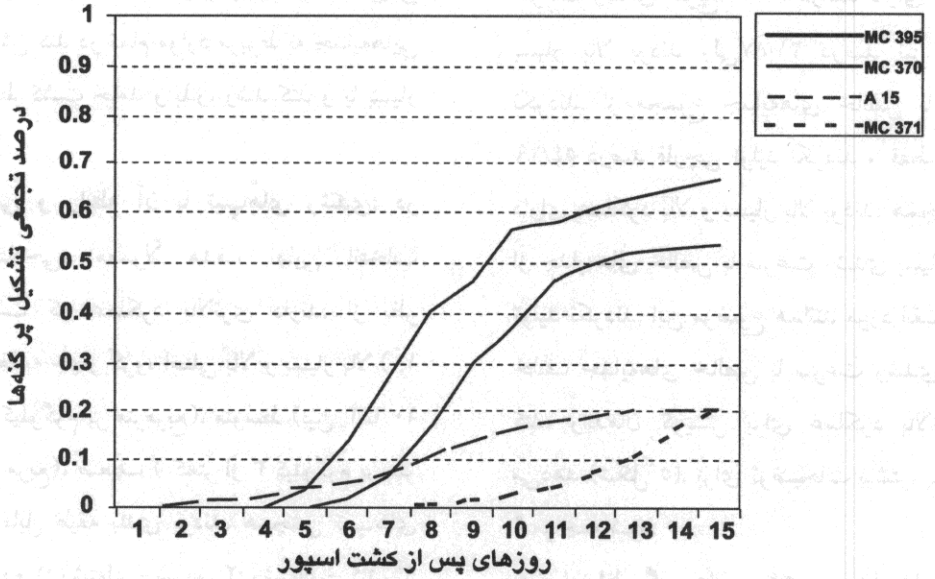
تنوع در میان نمونه‌های گرفته شده از کشتهای چند اسپوری: ۲۵-۲۰ روز پس از انتقال نمونه‌ها از نواحی مختلف کشت چند اسپوری، شبکه میسلیوم سراسر محیط کشت را اشغال و در نهایت جدایه‌هایی به‌دست آمد که از نظر شکل پرگنه و سرعت رشدی با هم متفاوت بودند. با این وجود، در بیشتر موارد از نظر شکل پرگنه، انواع پنبه‌ای و رشته‌ای و از نظر سرعت رشدی انواع سریع و کند مشاهده شد.

تنوع در بذر: ۲۰-۱٤روز پس از تلقیح دانه‌های گندم، انواع مختلفی از شکل پرگنه و سرعت رشدی در محیط

1- Li et al.
2- Heath et al.

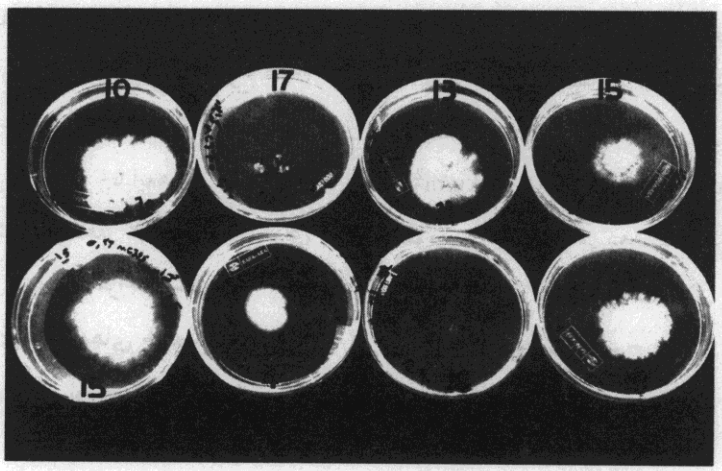
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ـ سرعت تشکیل پرگنه‌های منفرد چهارنژاد مختلف در محیط کشت PDA در طی ۱۵ روز کشت اسپور.

بذر مشاهده شد. در مورد جدایه‌های خالص، آن دسته از جدایه‌ها که در محیط کشت جامد، دارای پرگنه رشته‌ای بوده و از سرعت رشدی سریعی برخوردار بودند، در محیط بذر نیز به‌صورت رشته‌ای و سریع رشد کردند ($p\leq$۰/۰۱) (شکل ۳). اما در مورد نمونه‌های گرفته شده از کشت‌های چند اسپوری، بذر تهیه شده از آنها غالباً به صورت پنبه‌ای و کرکی بود. دلیل این امر احتمالاً آن بود که نمونه‌های گرفته شده از کشت‌های چند اسپوری، مخلوطی از دو یا چند اسپور بودند.



شکل ۲ـ تنوع در میان جدایه‌های خالص، ۲۰ روز پس از انتقال تک اسپورها.

ردیف بالا مربوط به نژاد MC370 است که به‌ترتیب از سمت راست انواع تیپ‌های رشدی: رشته‌ای ـ سریع، کرکی ـ کند، بسیار کند رشد، کرکی ـ سریع، مشاهده شدند. ردیف پایین مربوط به‌نژاد MC395 است، به‌ترتیب از سمت راست تیپ‌های رشدی: رشته‌ای ـ سریع، بسیارکند رشد، رشته‌ای ـ کند، بدون میسلیوم هوایی مشاهده شدند.

تنوع در بستر کشت: گسترش شبکه میسلیومی در بستر کشت از کند (پرکردن کمپوست در مدت یک ماه و یا بیشتر) تا سریع (پرکردن کمپوست در مدت کمتر از ۱۴ روز) متغیر بود. گسترش سریع غالباً مربوط به جدایه‌هایی

www.SID.ir

Archive of SID

بود که در محیط کشت جامد و بذر نیز رشد سریعی داشتند و گسترش کند در تمام موارد مربوط به جدایه‌هایی بود که در محیط کشت جامد و بذر، رشد کند و یا بسیار کندی داشتند.

آزمون میوه‌دهی و رابطه آن با تیپ‌های رشدی: در برنامه‌های اصلاحی، معمولاً هدف نهایی انتخاب جدایه‌هایی است که عملکرد بالاتری دارند. از نظر عملکرد جدایه‌ها به چهار گروه اصلی بالا و بسیار بالا (۱۰ و بیشتر از ۱۰ کیلوگرم بر مترمربع)، متوسط (بین ۳ تا ۱۰ کیلوگرم بر متر مربع)، ضعیف (کمتر از ۳ کیلوگرم بر متر مربع) و صفر قابل طبقه بندی بودند. همچنین تیپ‌های رشدی به ٦ گروه ۱: رشته‌ای- سریع، ۲: رشته‌ای- کند، ۳: کرکی- سریع، ٤: کرکی- کند، ٥: بدون میسلیوم هوایی- کند و ٦: بدون میسلیوم هوایی- بسیار کند، تقسیم شدند.

الف ـ ارتباط شکل پرگنه جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد: در میان جدایه‌های خالص با شکل پرگنه رشته‌ای، ۳۰درصد دارای عملکرد بالا و بسیار بالا بودند ولی ۳٦/٦٦درصد قارچی تولید نکردند. در میان جدایه‌های خالص با شکل پرگنه بدون میسلیوم هوایی، ٦٦/٦٧درصد قارچی تولید نکردند و فقط ۱۳/۳۳درصد دارای عملکرد بالا و بسیار بالا بودند. این موضوع نشان داد که حذف جدایه‌های خالص دارای شکل پرگنه بدون میسلیوم هوایی، راندمان گزینش جدایه‌های خالص با عملکرد بالاتر را افزایش می‌دهد (شکل ٤). برای توضیحات بیشتر، به شرح جدول ۱ مراجعه شود.

ب ـ ارتباط سرعت رشدی جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد: در میان جدایه‌های خالص با سرعت رشدی سریع، ۳۷/٥ درصد دارای عملکرد بالا و بسیار بالا بودند ولی۲۱/۸۷ درصد نیز قارچی تولید نکردند. از مجموع جدایه‌های خالص با سرعت کند، ٥٤/۲۹ درصد قارچی تولید نکردند و فقط ۱۷/۱٤ درصد دارای عملکرد بالا و بسیار بالا بودند. همچنین هیچ کدام از جدایه‌های خالص با سرعت رشدی بسیار کند، قارچی تولید نکردند. این موضوع همانند مورد الف، نشان داد که حذف جدایه‌های خالص با سرعت رشدی کند و بسیار کند، راندمان گزینش برای عملکرد بالاتر را افزایش می‌دهد (شکل ٥). برای توضیحات بیشتر، به شرح جدول ۱ مراجعه شود.

ج- ارتباط گروه‌های رشدی جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد: از ترکیب شکل پرگنه و سرعت رشدی، گروه‌های تیپ رشدی در نظر گرفته شدند. از میان ٦ گروه در نظر گرفته شده، تقریباً هیچکدام از جدایه‌هایی خالصی که تیپ رشدی آنها در محیط کشت جامد، بدون میسلیوم هوایی و کند یا بسیار کند رشد بود (گروه‌های ٥ و ٦)، قارچی تولید نکردند. از مجموع جدایه‌هایی که شکل پرگنه آنها در محیط کشت جامد، رشته‌ای و از رشد سریعی برخوردار بودند (گروه ۱)، ۳٦ درصد عملکرد بالا و بسیار بالا ($\geq$۱۰ kg/m^2)، ۹ درصد بدون اندام زایشی و بقیه عملکرد متوسط (۳-۱۰kg/m^2) یا ضعیف ($\leq$۳ kg/m^2) داشتند. این موضوع نیز نشان می‌دهد که حذف تیپ‌های رشدی مورد نظر راندمان گزینش را افزایش می‌دهد (شکل ٦). برای توضیحات بیشتر، به‌شرح جدول ۱ مراجعه شود.

www.SID

Archive of SID

جدول ۱- جدول گزینش نهایی در میان تعدادی از جدایه‌های خالص نژاد A15

	محیط کشت جامد		بذر				محیط کشت جامد		بذر	
شماره جدایه	سرعت رشدی	شکل پرگنه	سرعت رشد	شکل پرگنه	عملکرد	شماره جدایه	سرعت رشدی	شکل پرگنه	سرعت رشدی	شکل پرگنه	عملکرد
۱	کند	ر	۱٤	ر	متوسط	۲۵	کند	ر	۳۰	ر	صفر
۲	کند	ب.م	۱٤	ر	بالا	۲٦	سریع	ر	۱٤	ر	صفر
۳	سریع	ک	۱٤	پ	متوسط	۲۷	سریع	ر	۱٤	ر	صفر
٤	کند	ر	۱٤	ر	ضعیف	۲۸	سریع	ر	۱٤	ر	بالا
۵	سریع	ر	۱٤	ر	بالا*	۲۹	کند	ر	۳۰	ر	بالا
٦	کند	ر	۱٤	پ	بالا	۳۰	سریع	ک	۱٤	ک	متوسط
۷	کند	ب.م	۱٤	ر	بالا	۳۱	کند	ب.م	۳۰	ک	صفر
۸	سریع	ر	۳۰	پ	ضعیف	۳۲	کند	ر	۳۰	ر	صفر
۹	بسیارکند	ر	-	-	-	۳۳	کند	ب.م	۳۰	ر	صفر
۱۰	سریع	ر	۱٤	ر	بالا	۳٤	کند	ر	۳۰	ر	صفر
۱۱	سریع	ر	۱٤	ر	ضعیف	۳۵	سریع	ر	۱٤	ر	بالا*
۱۲	کند	ب.م	۳۰	ر	صفر	۳٦	کند	ر	۳۰	ر	صفر
۱۳	سریع	ب.م	۱٤	ک	بالا	۳۷	سریع	ر	۱٤	ر	صفر
۱٤	سریع	ر	۳۰	ر	بالا	۳۸	سریع	ر	۱٤	ر	متوسط
۱۵	سریع	ک	۱٤	ک	بالا	۳۹	سریع	ک	۱٤	ک	بالا
۱٦	کند	ب.م	۱٤	ر	صفر	٤۰	سریع	ک	۱٤	ک	صفر
۱۷	سریع	ر	۱٤	ر	ضعیف	٤۱	کند	ب.م	۱٤	ر	متوسط
۱۸	سریع	ک	۱٤	ک	متوسط	٤۲	کند	ب.م	۱٤	ر	متوسط
۱۹	کند	ر	۱٤	ر	صفر	٤۳	کند	ر	۱٤	ر	متوسط
۲۰	سریع	ک	۱٤	ک	متوسط	٤٤	کند	ک	۱٤	ک	بالا*
۲۱	سریع	ر	۱٤	ر	متوسط	٤۵	کند	ب.م	۱٤	ک	متوسط
۲۲	سریع	ر	۱٤	ر	متوسط	٤٦	سریع	ک	۱٤	ک	بالا
۲۳	کند	ب.م	۳۰	ر	صفر	٤۷	سریع	ر	۳۰	ر	بالا
۲٤	سریع	ر	۱٤	ر	صفر	٤۸	بسیار کند	ب.م	۳۰	ر	صفر

زیرنویس جدول:

تیپ‌های رشدی در محیط کشت جامد عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار، ۲۰ روز پس از انتقال تک اسپورها به ظروف پتری ۱۰ سانتی‌متری و در محیط بذر، ۱٤ روز یا ۳۰ پس از تلقیح در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری مشاهده شد.

در ستون مربوط به سرعت رشدی در محیط کشت جامد: سریع: یعنی آنکه قطر رشد شعاعی میسلیوم پس از ۲۰ روز از ۵ سانتی‌متر بیشتر و حداکثر به ۱۰ سانتی‌متر رسید (یعنی یک ظرف پتری ۱۰ سانتی‌متری را پر کرد)، کند: یعنی آنکه قطر رشد شعاعی میسلیوم پس از ۲۰ روز ۵-۱ سانتی‌متر و بسیار کند یعنی آنکه رشد شعاعی میسلیوم پس از ۲۰ روز کمتر از ۱ سانتی‌متر بود.

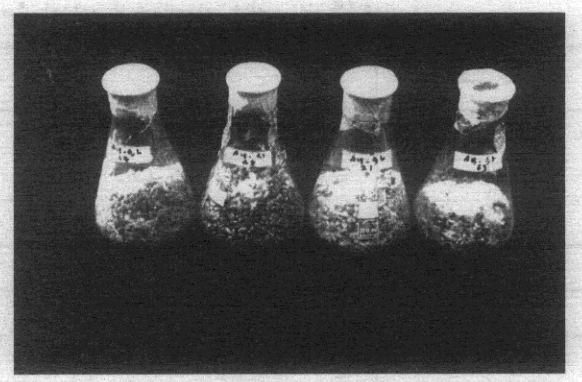
در ستونهای مربوط به شکل پرگنه: ر: رشته‌ای- ک: کرکی- پ: پنبه‌ای- ب.م: بدون میسلیوم هوایی.

در ستون مربوط به عملکرد: محاسبات بر اساس ٤۰ روز برداشت بدست آمده است. بالا و علامت بالا* به ترتیب یعنی عملکرد ۱۰ و بیش از ۱۰ کیلوگرم بر متر مربع ، متوسط یعنی عملکرد ۱۰-۳ کیلوگرم بر متر مربع، ضعیف یعنی عملکرد کمتر از ۳ کیلوگرم بر متر مربع، صفر یعنی در طی دوره مشاهدات (٤۰ روز)، هیچ اندام زایشی مشاهده نشد.

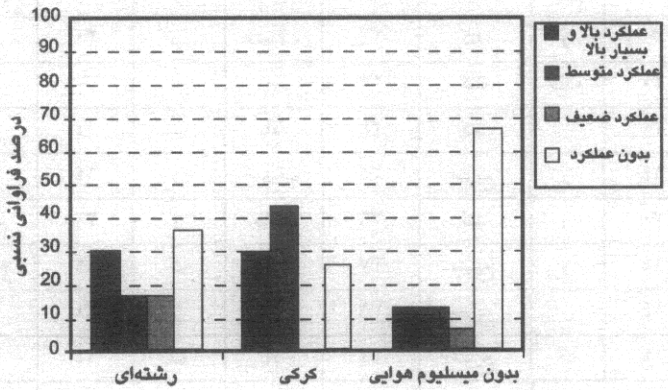
در ستون مربوط به سرعت رشدی در بذر اعدادی که معرف سرعت رشدی جدایه‌ها در بذر هستند، بر اساس زمانی که پس از تلقیح، تمامی دانه‌های گندم بوسیله میسلیوم اشغال شده‌اند، محاسبه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ـ تنوع در بذر، ۱٤ روز پس از تلقیح ئانه‌های گندم توسط جدایه‌های خالص نژاد A15، از سمت راست به‌ترتیب تیپ‌های رشدی: پنبه‌ای ـ کند؛ رشته‌ای ـ سریع، بسیار کند، رشته‌ای ـ سریع مشاهده شدند (به اطلاعات مندرج در جدول ۱ مراجعه شود)



شکل ٤ ـ ارتباط شکل پرگنه جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد.

در این مطالعه، تنوع جدایه‌های خالص گرفته شده از کشتهای تک اسپوری و نمونه‌های گرفته شده از کشت‌های چند اسپوری، براساس شکل پرگنه و سرعت رشدی مورد بررسی قرار گرفت. به نظر می‌رسد سه عامل تغییر دهنده زیر (جدا از عامل سطح پلوئیدی یعنی هموکاریون یا هتروکاریون بودن) منطقی‌ترین دلایل برای توجیه تنوعات در شکل پرگنه و سرعت رشدی جدایه‌ها باشند:

۱- کراسینگ‌اور که ممکن است در برخی مکانهای ژنی دور از سانترومر اتفاق بیافتد و مثلاً باعث هموزایگوس شدن برخی ژنها شود و در نهایت باعث تفاوت برخی بازیدیوسپورها نسبت به برخی دیگر شود.

۲- برخی آللها با پروموتورهای جدید یا نواحی تنظیمی سیس ـ اکتینگ[1] مرتبط شوند و بیان آنها متفاوت شود.

۳- بازآرایی کروموزومها[2] در هسته‌های هاپلوئید میوزی که در یک بازیدیوسپور بسته‌ندی می‌شوند، ممکن است محیط تنظیمی جدیدی برای تمام ژنها فراهم نماید. از نظر تنوع در شکل پرگنه، بایستی توجه داشت که هنوز تأثیر این عامل بر فنوتیپ جدایه‌ها اثبات نشده است و هنوز مشخص نیست که شکل‌های مختلف پرگنه بوسیله یک ژن کنترل می‌شوند یا چند ژن و آیا از نوع کیفی هستند یا کمی. از نظر تنوع در سرعت رشدی، انواع سریع، کند و بسیار کند در جدایه‌های مختلف قابل تشخیص بودند.

سرعت رشدی میسلیوم در هموکاریونها توسط چهار مکان ژنی که بر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارند، کنترل می‌شود. در هتروکاریونها نیز تخمین زده می‌شود که سرعت رشدی میسلیوم توسط تعداد زیادی مکان ژنی کنترل می‌شود. بنابراین سرعتهای رشدی مختلف توسط

1- cis-acting

2- re-assortment

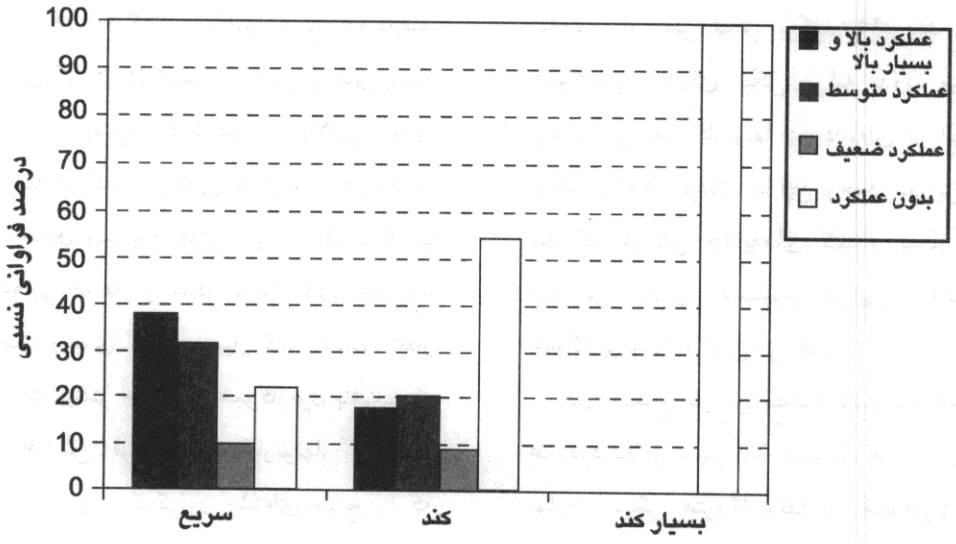
www.SID

Archive of SID

مکانهای ژنی صفات کمی[3] کنترل می‌شوند و گزینش آنها بایستی با توجه به عامل محیط و در تکرارهای زیاد انجام پذیرد.

در این مطالعه علاوه بر استفاده از جدایه‌های تک اسپور، از جدایه‌های گرفته شده از کشتهای چند اسپوری نیز استفاده گردید. در یک کشت چند اسپوری، همزمان مخلوطی از دو یا بیشتر تیپ رشدی مشاهده شد. سپس جداسازی این تیپ‌های رشدی با واکشت‌های متعدد از انتهای پرگنه، انجام گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که گزینش براساس کشت چند اسپوری به سهولت و سرعت می‌تواند در بهبود ژنتیکی نژادهای موجود داخلی مؤثر باشد، زیرا در یک کشت چند اسپوری، همزمان چند تیپ رشدی در اختیار است و اگر تعداد کشتهای چند اسپوری بیشتر باشد، چندین تیپ رشدی از یک نژاد در اختیار قرار می‌گیرد.علاوه بر این، تولید یک کشت چند اسپوری ساده است، زیرا به تنظیم دقیق رقت اسپورها و جدا کردن تک اسپورهایی که تندش کرده‌اند، نیازی نیست. با این وجود، در این مطالعه ما نتوانسیم به ارتباط معنی‌داری بین تیپ رشدی جدایه‌های انتخاب شده از یک کشت چند اسپوری و عملکرد دست یابیم. در نتیجه، استفاده از پتانسیل کشتهای چند اسپوری برای برنامه‌های اصلاحی، هنوز نیاز به کار بیشتری دارند.

با توجه به نتایج این مطالعه، در برنامه گزینش جدایه‌های خالص، با اطمینان قاطع می‌توان تیپ‌های رشدی گروه ۵ و ٦ را (یعنی آنهایی که دارای شکل پرگنه بدون میسلیوم هوایی و دارای سرعت رشدی کند یا بسیار کند هستند) حذف نماییم، زیرا بیشتر جدایه‌هایی که در این تیپ‌ها قرار دارند، در آزمون میوه‌دهی، عملکرد صفر یا بسیار پایینی خواهند داشت. بنابراین، می‌توان از تعداد نمونه‌های مورد گزینش در همان مرحله محیط کشت جامد یا بذر کاست. از طرف دیگر، می‌توانیم جدایه‌هایی را انتخاب نماییم که تیپ رشدی کرکی یا رشته‌ای و به‌ویژه رشته‌ای سریع دارند، چون بیشتر جدایه‌هایی که در این تیپ‌ها قرار داشتند، در آزمون میوه‌دهی عملکرد متوسط یا بالایی داشتند و تعداد کمی از آنها، عملکرد ضعیف یا صفر داشتند. در اینجا، مؤثرترین انتخاب مربوط به جدایه‌های دارای شکل پرگنه رشته‌ای و سرعت رشدی سریع (در محیط کشت جامد) است که بیش از ۳٦ درصد از آنها عملکرد بالایی نشان دادند..

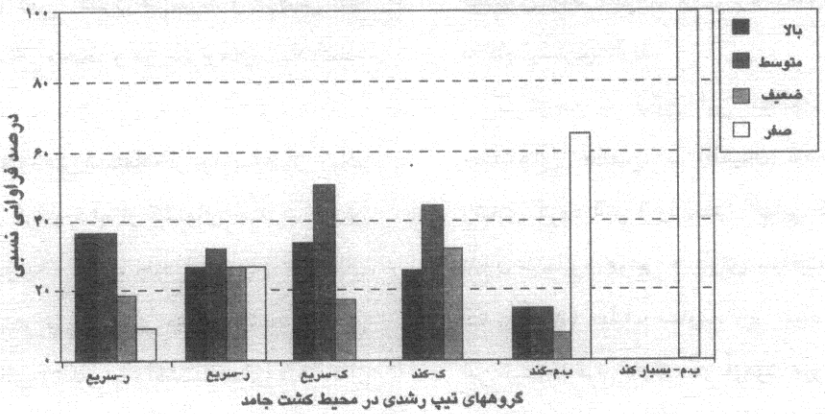


شکل ۵ـ ارتباط سرعت رشد جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد

3- QTL (Quantitative Trait Loci)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٦ـ ارتباط کلاسهای رشد (شامل شکل پرگنه و سرعت رشد) جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد.

گزینش هموکاریونها (یعنی آنهایی که قارچی تولید نمی‌کنند) برای برنامه‌های اصلاحی مبتنی بر هیبریداسیون، بسیار مهم است. افزایش راندمان انتخاب هموکاریونها در نتایج این آزمایشات نیز قابل بحث است. در نژاد A15، از مجموع ٤١ هتروکاریون، ٦١درصد در کلاس رشدی سریع و ٣٩درصد در کلاس رشدی کند قرار گرفته و هیچ هتروکاریونی در کلاس رشدی بسیار کند قرار نگرفت. همچنین، ٤٦درصد در کلاس رشدی رشته‌ای، ٤٢ درصد در کلاس کرکی و١٢درصد در کلاس رشدی بدون میسلیوم هوایی قرار گرفتند. در همین نژاد، از مجموع ٢٧ هموکاریون، ٢٦درصد در کلاس رشدی سریع، ٧٠ درصد در کلاس رشدی کند و ٤درصد در کلاس رشدی بسیار کند قرار گرفتند. همچنین، ٤١ درصد در کلاس رشدی رشته‌ای، ٢٢درصد در کلاس رشدی کرکی و ٣٧درصد در کلاس رشدی بدون میسلیوم هوایی قرار گرفتند. لذا با انتخاب جدایه‌هایی که دارای شکل پرگنه بدون میسلیوم هوایی و سرعت رشدی کند و بسیار کند باشند، انتظار خواهیم داشت که بیشتر جدایه‌ها، هموکاریون باشند. از طرفی، برای افزایش فراوانی هموکاریونها، می‌توانیم تیپ‌های رشدی به ویژه کرکی و رشته‌ای سریع را که بیشتر آنها هتروکاریون هستند، حذف نمود. در تحقیقی توسط کریگان و همکاران (١٩٩٢)، دو کلاس هموکاریون و هتروکاریون با توجه به مورفولوژی پرگنه، غیر قابل تشخیص بودند ولی اختلاف برجسته‌ای در توزیع سرعت‌های رشدی در میان هموکاریونها و هتروکاریونها مشاهده شد. در این توزیع نوعی همپوشانی وجود داشت، بطوریکه هتروکاریونها در تمامی کلاسهای رشدی دیده شدند. با این وجود، هموکاریونها فقط در کلاسهای کند رشد دیده شدند و انتخاب این کلاسها، راندمان گزینش هموکاریونها را افزایش داد. در مطالعه دیگری، نتایج نشان داد از نظر سرعت رشدی، ٧٥درصد از جدایه‌های هموکاریون در دو کلاس کند و بسیار کند رشد قرار گرفتند و ٢٥درصد بقیه در کلاس رشد میانه قرار گرفتند. اما هتروکاریونها در تمامی کلاسهای رشدی مشاهده شدند. از نظر شکل پرگنه، ٩٥درصد از جدایه‌های هموکاریون، دارای شکل پرگنه بدون میسلیوم هوایی بودند ولی هتروکاریونها در دامنه‌ای از انواع شکل‌های پرگنه، پراکنده بودند. با این وجود، در این مطالعه ثابت شد که گزینش جدایه‌های کند و بسیار کند رشد و همچنین دارای میسلیوم هوایی، راندمان گزینش هموکاریونها را افزایش می‌دهد.

در مجموع، در این مطالعه ثابت شد که جدایه‌های با عملکرد بالا و بسیار بالا، متوسط، ضعیف و صفر و یا به عبارت دیگر هتروکاریونها و هموکاریونها، در اکثر گروههای تیپ رشدی پراکنده‌اند و با یکدیگر هم پوشانی دارند. با این وجود، برای افزایش راندمان گزینش جدایه‌های با عملکرد بالا و یا گزینش هموکاریونها استفاده از تیپ‌های رشدی کمک شایانی می‌نماید. البته

www.SID.ir

Archive of SID

در نهایت بایستی جدایه‌های انتخابی مورد آزمون عملکرد و یا میوه‌دهی قرار گرفته و جدایه‌هایی که عملکرد دلخواه را نشان می‌دهند، انتخاب و برای آزمونهای بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

منابع

۱.فارسی، م و ح. ر. گردان. ۱۳۸۱. تولید بذر هیبرید در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید، *Agaricus bisporus* بمنظور افزایش عملکرد. مجله علوم و صنایع کشاورزی، جلد ۱۶، شماره ۱، ص. ۱۳۳-۱۲۵.

۲.فارسی، م.، کاوسی، ح.ر. و گردان، ح. ر. ۱۳۸۲. بررسی قابلیت مارکرهای مورفولوژیکی در شناسایی ایزوله‌های هموکاریون قارچ دکمه‌ای سفید. سومین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران، مشهد مقدس، ۲۰-۱۸ شهریور ۱۳۸۲، جلد دوم، ص. ۴۰۸-۴۰۵.

۳.گردان، ح. ر. ۱۳۷۹. بررسی امکان تولید بذر هیبرید با عملکرد بالا در قارچ خوراکی دگمه‌ای سفید. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، ۱۴۳ ص.

4.Castle, A.J., P.A., Horgen, and J.B. Anderson. 1988. Crosses among homokaryons from commercial and wild collected strains of the mushroom *Agaricus brunnescens* (= *Agaricus bisporus*). Apple. Environ. Microbiol., 54: 1643-46.

5.Elliott, T.J. 1972. Sex and the single spore. Mushroom Sci. 8:11-180.

6.Heath, M.C., A., Li, P.A., Horgen, and P.L. Tam. 1995. Hyphal morphology associated with strain instability in the commercial mushroom, *Agaricus bisporus*. Mycologia, 87(4):442-50.

7.Horgen, P.A., and A. Castle. 2002. The application and potential of molecular approaches to mushrooms. p. 2-17, In Kempken (ed.) The Mycota XI: Agricultural Applications. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

8.Horgen, P.A., K.F., Kokurwicz, and J. B. Anderson. 1989. The germination of basidiospores from commercial and wild collected isolates of *Agaricus bisporus* (= *Agaricus brunnescens*). Can. J. Microbiol., 35: 492-98.

9.Horgen, P.A., and J.B. Anderson. 1992. Biotechnology and edible mushrooms. p. 447-462, In D. Finkerlestein and C. Ball (eds.) Biotechnology and Filamentous Fungi. Butter Woth, Boston.

10.Kerrigan, R.W. 1990. Evidence of genetic divergence in two populations of *Agaricus bisporus*. Mycol. Res. 94: 721-33

11.Kerrigan, R.W. 2000. A brief history of marker assisted selection in *Agaricus bisporus* . Mycol. Res., 94:721-33.

12.Kerrigan, R.W, J.C., Royer, L.M., Baller, P.A., Horgen, and J.B. Anderson. 1992. Strategies for the efficient recovery of *Agaricus bisporus* homokaryons. Mycologia, 84: 575-79.

13.Kerrigan, R.W, J.C., Royer, L.M. Baller, Y. Kohli, P.A. Horgan, and J.B. Anderson. 1993. Meiotic behaviour and Linkage relationships in the secondarily homothalic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics, 133: 225-36.

14.Khush, R.S., M.P. Wach, and P.A. Horgen. 1995. Molecular strategies for *Agaricus* breeding. p. 321-327, In Kuck (ed) The Mycota II: gentics and biotechnology. Berlin: Springer- Verlag. PP. 321-27.

15.Kokorwicz, K.F., and P.A. Horgen. 1994. Optimizing basidiospore germination in *Agaricus bisporus*. Cultivated Mushroom Research (CMR), News Letter 2: 21-23.

16.Li, A., M., Begin, K., Kokurwicz, C., Bowden, and P.A. Horgen. 1994. Inheritance of strain instability (Sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Appl. Environ, Microbiol., pp.2384-88.

17.Loftus, M.G., S.C., Lodder, and E.J. Legy. 1995. Molecular mushroom breeding. p. 3-9, In T.J. Elliott (ed) Science and Cultivation of Edible Fungi. Balkema, Rottedam.

18.Mehta, K.B., and M.S. Bhandal. 1994. Genetic improvement in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. p. 70-77, In M.C. Nair, C. Gokulapalan and L. Adan (eds) Advances in Mushroom Biotechnology. Scientific Publishers, Jodhpor, India.

19.Miles, P.G., and S.T. Chang. 1997. Mushroom Biology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Singapore, 194 p.

www.SID.ir

Archive of SID

20.Miller, R.E. 1971. Evidence of sexuality in the cultivated. mushroom, *Agaricus bisporus*, Mycologia, 63: 630-34.
21.Pandey, M. and R.P., Tewari. 1994. Strategies for selection and breeding of edible mushroom. p. 51-69, In: M.C. Nair, C. Gokolapalan and L. Adein (eds) Advances in Mushroom Biotechnology. Scientific Publisher, Jodhpur, India.
22.Pathak, V.N., N., Yada, and G. Maneesha. 1998. Mushroom Processing Technology. Agro Botanica, India, 197pp.
23.Raper, C.A., J.R., Raper, and R.E. Miller. 1972. Genetic analysis of the life Cycle of *Agaricus bisporus*. Mycologia, 63:1088-1117.

www.SID.ir

Archive of SID

Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 11(2), Summer 2004
www.magiran.com/jasnr

Selection of pure isolates and multi spore cultures for breeding the white button mushroom

H.R. Gordan[1] and M. Farsi[2]
[1]Research department of Agricultural Biotechnology, [2]Department of Agronomy, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Abstract

The *Agaricus bisporus* breeding, has always been problematic. In this mushroom, secondary homothallism causes majority of basidiospores produce the self-fertile heterokaryons, while homokaryons, which are important in the breeding, are infrequent. The main objective of this study was the utilization of variation among pure isolates and isolates generated through multi spore cultures for the *Agaricus bisporus* breeding. The basidiospore cultures of several commercial exotic and domestic strains were prepared. Single and multi spore cultures were isolated and subjected to spwan and fruit bodies production. Based on colony type and growth rate, variation of basidiospores in solid culture medium, spawn and in compost was examined. The relationship between classes of colony types, growth rates and the yield was examined. The results showed that isolates with low growth produced no mushroom or had a few, but in majority of isolates with high growth, a high or moderate yield was observed.

Keywords: Agaricus bisporus; Breeding; Colony type; Growth rate; Selection

www.SID.ir