عوامل محیطی مؤثر بر پسروی نژادی اسپاون قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus Bisporus*)

مرتضی ترابی[۱]، محمد فارسی[۲*]، نسرین مشتاقی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی در کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

* farsi@um.ac.ir

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) از دیرباز تاکنون به عنوان یکی از مهم‌ترین قارچهای خوراکی در سرتاسر جهان و از جمله کشور ما کشت و پرورش داده می شود. همچون سایر محصولات کشاورزی، قارچهای خوراکی نیز تحت تأثیر عوامل تنش‌زای زنده و غیرزنده بخشی از عملکرد بالقوه خود را از دست می دهند. یکی از عواملی که موجب کاهش عملکرد قارچ دکمه‌ای می‌شود، پسروی نژادی یا دژنره شدن (استرومایی شدن) اسپاون قارچ خوراکی دکمه‌ای است. در این پژوهش برخی عوامل محیطی از جمله دما، غلظت و pH محیط‌کشت، حضور و عدم حضور نشاسته در محیط‌کشت، وجود ترکیبات نفتی و واکشت گرفتن های مکرر از میسلیوم در دو نژاد هلند ۷۳۷ و H_2 و تأثیر آن بر نحوه رشد میسلیوم قارچ خوراکی بررسی گردید. درتیمار آلودگی محیط کشت با مواد نفتی میسلیوم‌ها به صورت استرومایی رشد کردند و با واکشت گرفتن‌های مکرر و یا افزودن نشاسته به محیط کشت نیز پدیده سکتورینگ در رشد میسلیوم‌ها ظهور کرد. در نهایت در تمامی بررسی‌های انجام شده هرگونه انحراف شدید از شرایط طبیعی رشد، منجر به تغییر مورفولوژیکی در نحوه رشد میسلیوم‌ها گردید و باعث رشد غیرنرمال، و بروز سکتورینگ در سطوح مختلف گردید.

کلمات کلیدی: اسپاون، استرومایی شدن، پسروی نژادی، سکتورینگ، قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید

مقدمه

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، معروفترین قارچ خوراکی در دنیا می باشد. از حدود سال ۱۶۵۰ میلادی این قارچ در حومه پاریس کشت می شده است. پس از آن کشت این قارچ در اروپا و آمریکا در طی قرن های ۱۸ و ۱۹ نیز گسترش پیدا کرد. از دهه ۱۹۶۰ میلادی پرورش این قارچ به شیوه ی مدرن و امروزی آغاز گردید و فناوری تولید و پرورش این قارچ پس از این با تأسیس آزمایشگاه‌های تحقیقاتی در اروپا وآمریکا پا به عرصه جدیدی گذاشت (۱). بر اساس آمار فائو تولید این قارچ در جهان در سال ۲۰۱۳ حدود ۱۰ میلیون تن بوده است و در سال ۲۰۱۶ به حدود ۱۱ میلیون تن رسیده است. تولید سالانه قارچ در کشور ایران ۱۵۰ هزار تن در سال است و کشور ایران رتبه هشتم تولید قارچ در دنیا را دارد. سرانه مصرف قارچ در دنیا چهار کیلوگرم و در ایران ۱,۲ کیلوگرم است.

به بذر اولیه قارچ اسپاون[1] گفته می شود که وجه تسمیه آن لغت فرانسوی اسپاندر است. اسپاون به میسلیوم رشد کرده بر روی یک ماده غذایی، که از آن ماده برای رشد خود استفاده می‌کند، گفته می شود. تولید اسپاون یکی از مهمترین مراحل تولید قارچ خوراکی دکمه ای سفید است به طوریکه یکی از دلایل عملکرد پایین این قارچ در ایران نامرغوب بودن اسپاون‌های وارداتی و

[1] Spawn

گرفتن واکشت های مکرر از این اسپاون‌ها می‌باشد که باعث ضعیف شدن اسپاون‌های مورد استفاده توسط شرکت های پرورش دهنده می‌شود (۱).

بررسی‌ها نشان داده است که قارچ‌های رشته‌ای سطح بسیار بالایی از تنوع مورفولوژیکی و بی‌ثباتی را در طی زمان نشان می‌دهند. این بی ثباتی‌ها در قارچ‌های خوراکی به صورت تغییرات مورفولوژیکی بروز می‌کند، که این تغییرات شامل تفاوت در تولید هاگ، تنوع در شکل گیری هوایی میسلیوم، تغییراتی در رنگ هیف و انحراف از رشد شعاعی و منظم میسلیوم بر روی پتری جامد می‌باشند(۳). این تغییرات مانند بخش‌هایی هستند که به صورت کلونی رشد می‌کنند و حالت توده ای دارند، که به آنها سکتور[2]می‌گویند (۴). دو نوع مختلف سکتور برای قارچ خوراکی دکمه‌ای تعریف شده است یکی از این سکتورها که رشد نمدی و پنبه ای شکل دارد را میسلیوم‌های استرومایی[3]می‌گویند و سکتورهایی که با تولید قطعات کرکی که رشد سریعتری نسبت به سایر میسلیوم‌ها دارند را میسلیوم کرکی[4]می‌گویند (۲). حفظ ثبات نژاد از اهمیت بالایی در تولید اسپاون برخوردار است که همین امر باعث ایجاد نگرانی در صنعت تولید اسپاون شده است. پسروی نژادی قارچ منجر به از دست رفتن نژاد شده و با ایجاد مناطق پنبه‌ای و نمد مانند در کیسه اسپاون و همچنین در بستر کشت منجر به کاهش شدید میوه‌دهی قارچ خوراکی می‌شود و در موارد شدید باعث عدم تولید محصول در قارچ می‌گردد.

مواد و روش‌ها

آزمایش‌ها در این تحقیق بر اساس فرضیات زیر برای قبول یا رد فرضیه ها طراحی شدند. فرضیاتی که برای پنبه‌ای و استرومایی شدن اسپاون و نژاد قارچ خوراکی دکمه‌ای ایجاد شد، به شرح زیر است:

۱. حضور آلودگی‌های نفتی و گازهای شیمیایی بر پایه نفت در محیط رشد قارچ دکمه‌ای
۲. فقر غذایی محیط کشت
۳. تغییرات pH
۴. رشد میسلیوم و نگه‌داری اسپاون در دماهای بالا
۵. واکشت گرفتن‌های مکرر نژاد در شرایط آزمایشگاه
۶. حضور نشاسته در محیط کشت

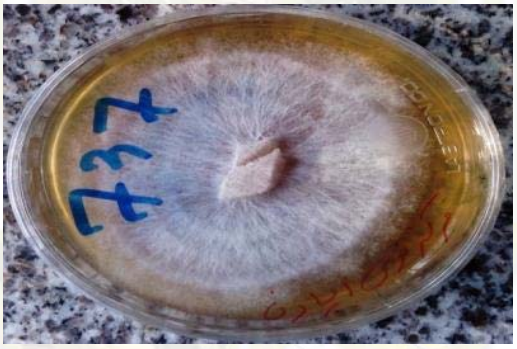
میسلیوم نژادهای قارچ دکمه‌ای از شرکت تولید اسپاون قارچ‌های خوراکی و دارویی توس اسپاون تهیه گردید و اجرای آزمایش‌ها در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گردید. محیط کشت مورد استفاده در آزمایش‌ها CE/CYM[5] بود و pH محیط‌کشت‌ها بر روی ۶/۵ تنظیم و پس از کشت میسلیوم در زیر هود استریل تا زمان رشد کامل در دمای ۲۴ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. برای بررسی نحوه رشد میسلیوم در pH های مختلف، محیط کشت‌های جامد در اسیدیته ۶، ۷، ۸ و ۸/۵ برای هر نژاد در سه تکرار تهیه و کشت جامد میسلیوم انجام شد. برای بررسی اثرات دمایی، میسلیوم‌های هر نژاد پس از کشت در دماهای ۲۴، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. تیمار دمایی ۳۵ درجه به صورت کشت مایع انجام شد و مابقی در پتری جامد کشت شدند. برای بررسی فقر محیط غذایی نیز محیط‌کشت‌ها در دو تیمار یک برابر و یک دوم برابر تهیه و کشت میسلیوم‌ها در آن‌ها انجام گرفت. در بررسی اثرات نشاسته، محیط کشت CE/CYM جامد با این تفاوت که به جای دکستروز در محیط کشت از نشاسته با دوسطح یک برابر و دو برابر (به ترتیب ۱۰

[2] Sector
[3] Stromatal mycelium
[4] Fluffy mycelium
[5] Compost Extract/Complete Yeast Medium

و ۲۰ گرم در صد میلی‌لیتر محیط‌کشت) استفاده شده بود، آماده گردید و سپس کشت میسلیوم‌ها انجام گردید. برای بررسی آلودگی محیط کشت رشد قارچ به مواد نفتی، در محیط کشت جامد CE/CYM به میزان یک درصد از نفت سفید استفاده گردید و کشت میسلیوم نژادها انجام گرفت و در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گزاد انکوبه و مشاهدات ثبت گردید. پس از تهیه نژادها اولین واکشت گرفته شد و پس از اینکه حدود دو هفته از رشد آن می‌گذشت واکشت بعدی صورت گرفت و در نهایت ۱۰ واکشت مکرر و پشت سرهم از نژادها صورت گرفت. لازم به ذکر است که تمامی تیمارها با سه تکرار اجرا گردیدند.

نتایج و بحث

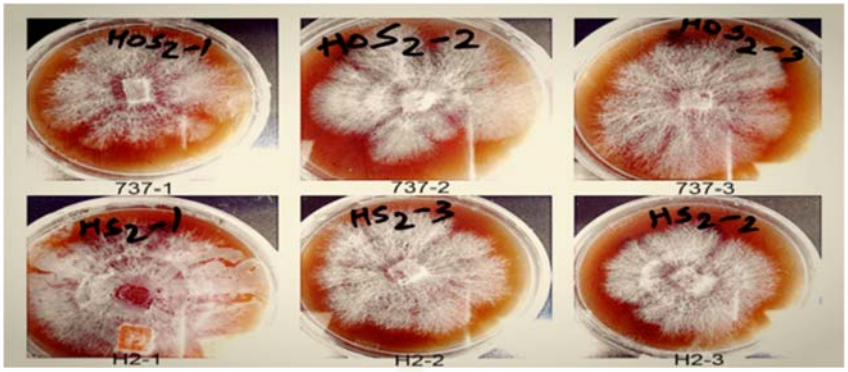
در اسیدیته ۶، ۷ و ۸ رشد میسلیوم‌ها طبیعی بود و نشانه‌ای از میسلیوم هوایی[6] و سکتورینگ مشاهده نگردید، در اسیدیته ۶ رشد کمی از حالت رشته‌ای خارج شده بود و در اسیدیته ۸/۵ از همان ابتدا رشد میسلیوم‌ها در هر دو نژاد و در تمامی تکرارها با چندین سکتور مشخص شروع شد و رشد میسلیوم‌ها در سکتورهای مجزا ادامه یافت همچنین در ابتدای رشد، رشد میسلیوم‌ها به صورت هوایی بود و فرار از محیط کشت را نشان می‌داد اما پس از مدتی و در انتهای رشد دوباره به حالت رشد غیر هوایی برگشتند. شکل ۱ رشد طبیعی و بدون ناهنجاری رشدی میسلیوم قارچ دکمه‌ای، در محیط کشت را نشان می‌دهد.
در دمای ۲۴ درجه‌سانتی گراد رشد هر دو نژاد رشته‌ای و بدون حضور سکتور بود. در دمای ۳۰ درجه‌سانتی‌گراد رشد بسیار بسیار کند شد و آنقدر کند بود که دیگر قارچ‌های پارازیت و باکتری‌ها بالاخره بر قارچ دکمه‌ای غالب می‌شدند. دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نیز کشت به صورت مایع انجام شد در این دما میسلیوم زنده نمی‌ماند و از بین می‌رفت. در دماهای بالا به علت کندی رشد و عدم پیشروی زیاد میسلیوم بر روی محیط تشخیص دقیق سکتورها مشکل بود.



شکل ۱. رشد رشته‌ای و کاملا طبیعی میسلیوم قارچ دکمه‌ای در محیط کشت CE/CYM

وقتی که رقت محیط کشت کم شد میسلیوم‌ها رشد و پیشروی به سمت جلو داشتند اما رشد کند شد و کمی از حالت رشته‌ای خارج و به شکل کرکی در آمد. در این تیمارها سکتورینگ و تقسیم شدن رشد میسلیوم به بخش‌های مجزا دیده نشد. در تیمار حضور نشاسته در محیط‌کشت در هر دو تیمار یک برابر و دو برابر رشد میسلیوم‌ها از همان ابتدا با سکتوردهی فراوان و رشد با میسلیوم هوایی همراه بود همچنین تغییر رنگ در محیط کشت داشتیم و هاله‌ای در زیر محل رشد میسلیوم‌ها مشاهده می‌گردید. در این محیط کشت علاوه بر سکتورینگ مشاهده شده در برخی پتری‌ها نیز شکل پیشرفته‌تری از ناهنجاری رشدی در زمان رسیدن به دیواره پتری مشاهده گردید و تراکم رشد میسلیوم بیشتر بود (شکل ۲).

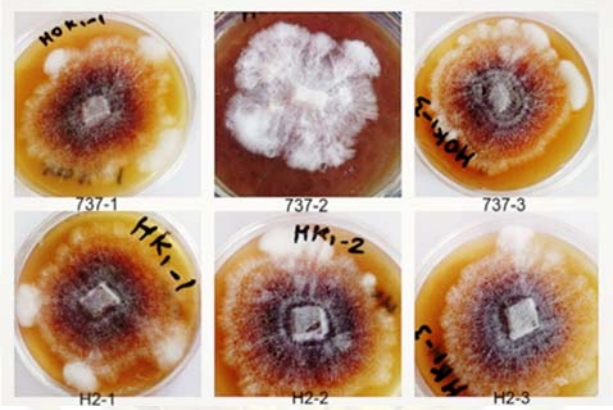
[6] Overlay



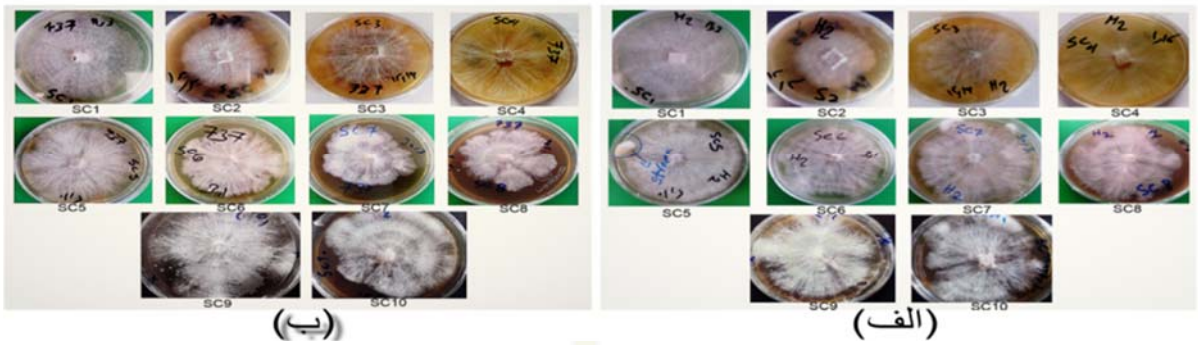
شکل ۲. کشت میسلیوم‌ها در ۲۰۰ گرم در لیتر نشاسته. پتری‌های بالا مربوط به نژاد هلند ۷۳۷ و پایین نژاد H_2 است. در این تیمار رشد میسلیوم‌ها با حضور سکتور شدید همراه گردید و ناهنجاری در رشد میسلیوم‌ها دیده می‌شود.

در تیمارهای محیط‌کشت به همراه یک درصد نفت سفید، سرعت رشد میسلیوم بسیار کم شد اما سکتوردهی، تشکیل میسلیوم هوایی و همچنین بروز ناهنجاری رشدی در سطح پیشرفته‌تر و تشکیل نقاط استرومایی شدت یافت. تیمارها هرکدام با سه تکرار بود برای تایید آزمایش دو سری دیگر نیز مجددا کشت با سه تکرار انجام شد و در آن‌ها نیز تمامی ناهنجاری‌ها تکرار شدند. برای بررسی رشد میسلیوم‌ها در نسل‌های بعدی، میسلیوم حاصل از سکتورهای نفتی در محیط کشت بدون آلودگی نفتی صورت گرفت و در این کشت‌ها نیز سکتورینگ و میسلیوم هوایی نیز دوباره با شدت کمتر تکرار شد (شکل ۳).

در تیمار واکشت گرفتن مکرر میسلیوم، در واکشت‌های اولیه تعداد سکتوردها و تشکیل استروما و دیگر ناهنجاری‌های رشدی بسیار کم بود اما رفته رفته بر تعداد آن‌ها همانطور که به سمت واکشت‌های نهایی می‌رفتیم افزوده گردید و از رشد شعاعی و کاملا یکنواخت میسلیوم‌ها کاسته گردید. از واکشت چهارم کم‌کم سکتوردهی نژاد شروع شد و از واکشت هفتم به بعد به اوج خود رسید (شکل ۴).



شکل ۳. کشت میسلیوم‌ها در محیط کشت CE/CYM به همراه یک درصد نفت سفید. پتری‌های بالا نژاد هلند ۷۳۷ و پایین نژاد H_2. رشد میسلیوم‌ها غیر نرمال، غیر رشته‌ای، پنبه‌ای و استرومایی است.



شکل ۴. ده واکشت مکرر و پشت سرهم از میسلیوم نژاد هلند ۷۳۷ و H_2. الف: نژاد H_2 و ب: نژاد هلند ۷۳۷. در هر دو نژاد ناهنجاری‌ها تقریبا پس از واکشت چهارم شروع می‌شود و در واکشت‌های نهایی به نهایت خود رسیده است.

تاکنون دلایل مشخصی برای سکتورینگ شناخته نشده است، اما در ارقام تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای در مرحله رشد و میوه‌دهی حداکثر فشار و استرس وجود دارد، و این فشار منجر به یک تمایل نسبی به سمت پسروی نژادی دارد (۴). نتایج نشان داد، بیشتر تنش‌های محیطی در قارچ‌های خوراکی منجر به پسروی نژادی و از دست رفتن نژاد می‌شود، تولیدکنندگان اسپاون بایتسی مداوماً سعی در تهیه و اصلاح نژادهای مادری جدید، با رشد طبیعی و بدون پسروی نمایند و از تهیه اسپاون از طریق واکشت مکرر اسپاون‌های تجاری جلوگیری کنند و تولید اسپاون را با دانه‌هایی که سطح نشاسته کمتری دارند انجام دهند. تولید کننده‌های کمپوست نیز بایستی کمپوستی با حداقل آلودگی با مواد نفتی و یا مواد بر پایه نفت که بیشتر توسط ماشین‌آلات تهیه‌آن آلوده می‌شود، تولید کنند و همچنین تولید کننده‌های اسپاون نیز برای بسته بندی اسپاون از موادی استفاده کنند که در دمای بالای استریل‌سازی، منجر به تولید گازهای شیمیایی بر پایه نفت نکند و منجر به پسروی و دژنره‌شدن اسپاون و خسارت به تولید کننده نشود.

منابع و مراجع مورد استفاده

1. Farsi, M., Pourianfar, H. R., 1390. Cultivation and Breeding of the White Button Mushroom. Second Edition, Jahad-e Daneshgahi Mashhad Publishers, Mashhad, The Iran, p.275.
2. Horgen, P. A., Carvalho, D., Sonnenberg, A., Li, A., Van Griensven, L,. 1996. Chromosomal abnormalities associated with strain degeneration in the cultivated mushroom, Agaricus bisporus. Fungal Genetics and Biology. 20(3):229-41.
3. Lambert, E. B., 1938. Principles and problems of mushroom culture. The Botanical Review. 4(7):397-426.
4. Li A., Begin, M., Kokurewicz, K., Bowden, C., Horgen, P. A, 1994. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. Applied and environmental microbiology. 60(7):2384-8.

Environmental factors affecting the spawn degeneration in white button mushroom, *Agaricus bisporus*

M. Torabi[1], M. Farsi[2*], N. Moshtaghi[3]
1- M.Sc. student, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Prof, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3- Associate Prof, Department of Crop Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
*farsi@um.ac.ir

Abstract
White button mushrooms (*Agaricus bisporus)* are the most important edible mushroom in the world. The yield of edible mushroom, like other crops, is affected by biotic and abiotic stresses. Strain degeneration is one of the factors reducing the yield of mushroom. In this research, some environmental factors such as temperature, concentration and pH of the medium, presence and absence of starch in the medium, the presence of petroleum compounds and recurrent sub-cultures of mycelium in Holland 737 and H_2 strain was studied. When we added 1% of kerosene to the culture medium, mycelium grows in cottony and stromatal form and with recurrent sub-cultures or adding starch to the culture medium; the sectoring phenomenon appeared in the growth of mycelia. Finally, in all studies, any severe deviation from natural growth conditions led to a morphological change in mycelia growth, abnormal growth, and incidence of sectoring at different levels.
Keywords: *Agaricus bisporus*, sectoring, strain degeneration, stromatal growth, White button mushroom,