تولید هیبرید قارچ خوراکی صدفی (*Pleurotus ostreatus*) با استفاده از تلاقی تک اسپور

مهین ناظری[1]، محمد فارسی[2]، حسن مرعشی[2]، فرج الله شهریاری[2]، جواد جانپور[3]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه فردوسی مشهد

۲. عضو هیات علمی گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. عضو هیات علمی گروه زیست فناوری قارچ های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

Email: nazeri.mahin@stu.um.ac.ir

چکیده

تولید بالا و کیفیت مناسب همیشه از اهداف اصلی در تولیدات کشاورزی و به خصوص قارچ‌های خوراکی محسوب می‌شود. توسعه و بهبود نژادهای قارچ خوراکی، به خصوص گونه‌های قارچ صدفی بدلیل اهمیت فوق العاده‌ای که برای انسان، نظیر خواص ضد سرطانی، دارویی و آنتی اکسیدانی و غذادارویی در این قارچ وجود دارد باید بصورت اولویت در تحقیقات حوزه کشت قارچ محسوب شود. بدین منظور در این مطالعه از قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) ۶۰ ایزوله تک اسپور تهیه شد که با بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی، از قبیل سرعت رشد، تیپ رشدی، بررسی حضور و عدم حضور ارتباط کلامپ و آزمون میوه‌دهی در پتری‌دیش ایزوله مناسب جهت انجام تلاقی شناسایی شدند. در نهایت با انجام تلاقی‌های دای آلل هیبریدهایی بدست آمد که سرعت رشد بیشتری داشتند. در آزمایشات بعدی عملکرد هیبریدهای امید بخش در سالن‌های کشت تحت شرایط استاندارد بررسی خواهد شد.

کلمات کلیدی: ارتباط کلامپ ،پلوروتوس استراتوس، قارچ صدفی، هیبرید

مقدمه

افزایش قیمت مواد غذایی، به دلیل قیمت بالای سوخت‌های زیستی منجر به کمبود مواد غذایی در بسیاری از کشورها شده است. در حا حاضر انسان‌های زیادی در جهان هستند که از سوءتغذیه رنج می‌برند. یکی از گزینه‌های قابل اعتماد و سودآور در کاهش تاثیرات گرسنگی و سوءتغذیه در جهانی که بیش از پیش با افزایش هزینه‌های غذایی روبروست تولید قارچ‌های خوراکی می‌باشد. قارچ‌ها گروه بسیار بزرگی از موجودات را تشکیل می‌دهند. تعداد گونه‌های قارچ ۱/۵ میلیون تخمین زده شده است، از بین آن‌ها تقریباً ۳۰۰ گونه قارچ خوراکی هستند، که تنها ۳۰ گونه به‌صورت اهلی در آمده‌اند و ۱۰ گونه تجاری‌سازی شده‌اند. بعد از قارچ *Agaricus bisporus* گونه‌های جنس *Pleurotus* مهمترین گونه‌های قارچی در جهان می‌باشند (۵). اولین تلاش‌ها به منظور کشت قارچ صدفی قابل مصرف برای انسان مربوط به جنگ جهانی اول در کشور آلمان می‌باشد (۱). در کنار اهمیت غذایی، این قارچ صدفی در صنعت سفید کردن کاغذ و تهیه لوازم آرایش مورد استفاده قرار می‌گیرد و پتانسیل این را دارد که در مصارف صنعتی از آن استفاده شود. همچنین این قارچ نقش مهمی در افزایش فعالیت ماکروفاژی لنفوسیت‌ها، کاهش سطح کلسترول خون ، افزایش خواص ضد مکملی پلی ساکاریدها و افزایش دهنده فعالیت‌های ضد سرطانی[1]دارد. این قارچ در تجزیه لیگنین نقش به سزایی ایفا می‌کنند. تا به امروز گونه‌هایی از قارچ صدفی که قابلیت کشت و کار در دماهای بالا را دارند، نظیر؛ *P. pulmonarius* ،*P. tuber-regium* ،*P. djamor* بسیار مورد توجه کشاورزان قرارگرفته‌اند و جهت بهبود صفات، به خصوص در مناطق استوایی مورد بررسی قرارگرفته‌اند (۲). این امر افزایش تقاضای مشتریان برای قارچ صدفی در جهان در طی چند سال اخیر را در پی داشته است. قارچ صدفی در بین کشاورزان به سازگارترین قارچ از نظر شرایط کشت شهرت دارد و در دامنه حرارتی ۳۲-۸ درجه سانتی‌گراد رشد می‌کند.

[1] anti hepatoma و anti-sarcoma

تولید بالا و کیفیت مناسب همیشه از اهداف اصلی در تولیدات کشاورزی و به خصوص قارچ‌های خوراکی محسوب می‌شود. توسعه و بهبود نژادهای قارچ خوراکی، به خصوص گونه‌های قارچ صدفی بدلیل اهمیت فوق العاده‌ای که برای انسان دارد باید به‌صورت اولویت در تحقیقات حوزه کشت قارچ محسوب شود. از این رو نه تنها باید برای کشف گونه‌های جدید وقت گذاشت بلکه باید با استفاده از تکنیک‌های اصلاحی جدید به جهت بالا بردن عملکرد، بهبود کیفیت، بافت، رنگ و طعم گونه‌های موجود نیاز رو به رشد جمعیت را برآورده ساخت. اصلاح کنندگان قارچ خوراکی به منظور اصلاح دو راه پیش رو دارند، یکی افزایش راندمان یک نژاد معین توسط گزینش و دیگری ایجاد تنوع جدید و بهره برداری از آن با استفاده از تولید هیبریدهای بین نژادها که در این بین کارآمدترین روش به نژادی ، تلاقی بین هموکاریون‌ها و گزینش از میان نتاج تلاقی است (۳).

مواد و روش

نمونه تازه و جوان قارچ صدفی (*P. ostretus*)، که اطمینان داشتیم اسپورهای آن هنوز پراکنده نشده‌اند از آزمایشگاه تحقیقات قارچ های خوراکی در جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، به منظور تهیه نقش اسپور[2] که متداولترین روش جهت تک اسپور گیری می‌باشد جمع آوری شد. بعد از گندزدایی قسمت‌های اضافی، کلاهک قارچ صدفی بر روی مقوای مشکی اتوکلاو شده قرار داده شد و سپس یک بشر استریل روی آن قرار داده شد و در زیر هود لامینار قرار گرفت تا اسپورها از آلودگی در امان باشند.

نقش اسپورها با استفاده از آب مقطر آمپولی شسته شدند و با استفاده از لام هومئوسایتومتری (نئوبار) غلظت سوسپانسیون در حجم 1ml اندازه گیری شد، با گرفتن تناسب، اندازه غلظت مناسب در این آزمایش ۴۰۰۰ اسپور در 1ml بدست آمد. سوسپانسوین مناسب بر روی محیط کشت PDA گسترده شده و اجازه داده شد تا اسپورها جوانه زده و رشد کنند. ۳۹ گرم پودر آماده PDA برند Merk در یک لیتر آب جهت تهیه محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت. بعد از گذشت سه روز از انکوباسیون اسپورها، جوانه زنی آنها در زیر بینی کولارمشاهده شد، و با استفاده از سرنگ انسولین استریل شده اقدام به برداشتن تک اسپورهای جوانه زده شده گردید. هر تک اسپور بدون برداشتن محیط اطراف آن و سایر میسیلیوم های اضافی به یک پتری‌دیش مجزا حاوی محیط PDA و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین که از قبل تهیه شده بود منتقل شد.

اندازه گیری خصوصیات مورفولوژیکی تک اسپورها

۱. خصوصیات مورفولوژیکی در قارچ‌ها جز صفاتی هستند که می‌توان از طریق آن‌ها ایزوله مناسب در مرحله رشد را جهت انجام تلاقی تشخیص داد، از این رو صفاتی از قبیل؛ نرخ رشد، تیپ رشد، حضور و یا عدم حضور رنگدانه و سایر صفات اندازه‌گیری گردید (جدول ۱).

نرخ رشد بصورت روزانه طی دوره ۸ روزه با استفاده از کولیس طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{نرخ رشد} = \frac{\text{متوسط اندازه ی دو قطر عمود برهم دایره رشدی در 8 روز}}{\text{تعداد روز ها}}$$

۲. بررسی ارتباط کلامپ[3]در ایزوله های تک اسپور در مجموع ۶۰ ایزوله از پتری‌دیش‌های اولیه ی رشد اسپور ها جداسازی شدند که همگی از نظر وجود ارتباط کلامپ مورد بررسی قرارگرفتند که این امر تاییدی بر دی‌کاریون[4]بودن آنهاست (عکس ۱).

به منظور استخراج DNA ژنومی قارچ صدفی از کیت استخراج DNA شرکت .Bio Basic Inc استفاده شد. جهت بررسی پلی مورفیسم DNA استخراج شده از هر ایزوله و شناسایی تک اسپورها با استفاده از نشانگر مولکولی، از مارکر رپید (RAPD) با

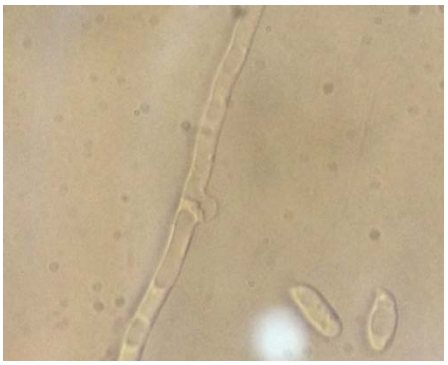
[2] spore print
[3] clamp connection
[4] dikaryon

توالی (5'CCC-ACT-GAC-G'3) استفاده شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام RAPD-PCR به ترتیب زیر انجام گرفت؛ First denaturation، ۱۸۰ ثانیه در دمای ۹۴°C- denaturation، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴°C- Annealing ، ۳۰ ثانیه در دمای ۴۱°C- polymerization ، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲°C - Final polymerization ، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. جهت بررسی محصولات نهایی PCR و مشاهده نتایج حاصل از پرایمر ها از ژل دو درصد Agarose-TBE استفاده گردید (عکس ۳). در این آزمایش بعد از انجام تلاقی از محل دیواره ارتباطی بین دو ایزوله به اندازه دو میلی‌متر برداشته شده، در پتری‌دیش جدید قرار داده شد تا رشد کند، سپس حضور و یا عدم حضور ارتباط کلامپ در هیبریدهای حاصل بررسی شدند.

بحث و نتیجه گیری

۷۰ ایزوله جداسازی شده از نظر ارتباط کلامپ مورد بررسی قرار گرفتند. که تنها ۱۱ نمونه بصورت ایزوله تک اسپور (بدون حضور ارتباط کلامپ در ۱۰۰٪ میسیلیوم های هرایزوله) تشخیص داده شدند. نمونه های حاصل از بررسی اولیه، از نظر صفات مورفولوژیکی و میکروسکوپی بررسی شدند (جدول شماره ۱) که اغلب دارای تیپ رشدی مشابه با یکدیگر داشتند اما سرعت رشدی در آن‌ها متفاوت بود. سپس ایزوله‌های حاصل طی واکنش RAPD-PCR از نظر پلی مورفیسم مورد بررسی قرار گرفت و پروفایل ژل نشان داد که اغلب ایزوله‌های با نمونه دی‌کاریون پلی مورفیسم دارند و با یکدیگر شباهت‌هایی در تعداد و سایز باندهای حاصل دارند عکس (شماره ۳). این آزمون در سه تکرار انجام شد و هر با نتیجه مشابه حاصل شد، بر طبق این نتیجه حاصل از مارکر رپید مونکاریون‌های حاصل در تلاقی های دای‌آلل شرکت داده شدند و هیبریدهای حاصل در درجه اول از نظر حضور ارتباط کلامپ، که فاکتور منحصر به راسته بازیدیومیست‌ها[5]می‌باشد و مکانسیم دقیقی برای اطمینان از حفظ موقعیت دی‌کاریون در حین رشد و گسترش هیف است و نشان دهنده ارتباط دی‌کاریونی می‌باشد مورد بررسی قرار گرفتند (۴)، سپس هیبریدها از نظر سرعت رشدی، تیپ رشدی و نوع و شکل میسلیوم مورد بررسی قرار گرفتند.

[5] basidiomycota



عکس ۱) ارتباط کلامپ با بزرگنمایی ۱۰۰

عکس ۲) پین دهی در پتری‌دیش بعد از شوک

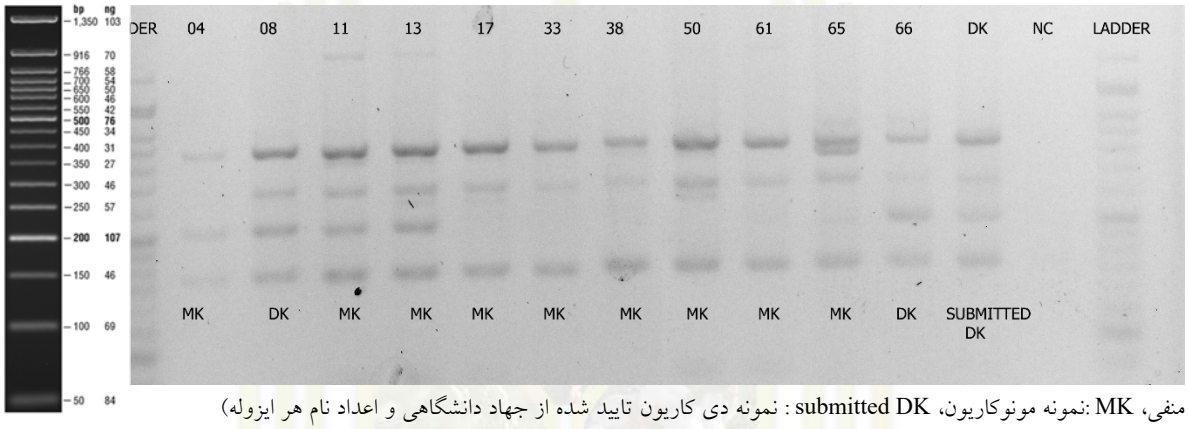
جدول ۱) بررسی صفات مورفولوژیکی درایزوله‌های تک اسپور

نمونه	های تعداد روز پر شدن کل دیش(روز)پتری	رنگ میسسیلیوم ها	هاظاهر میسیلیوم	الگوی رشد	حضور رنگدانه	نرخ رشد در ۸ روز (میلی متر در روز)
۵۷	۱۸	سفید	کم تراکم و یکنواخت	رشد هم هوایی دارد	–	۳,۳۵
۴۰	۱۰	سفید	پرتراکم- جارویی	رشد هم هوایی دارد	–	۴
۶۶	۱۲	سفید	رشته ای	رشد هم هوایی دارد	–	۴,۵۵
۳۳	۹	سفید	پنبه ای پرتارکم	رشد هم هوایی دارد	–	۵,۹۵
۵۰	۸	سفید	پنبه ای - تراکم متوسط	رشد هم هوایی دارد	–	۳,۸۵
۰۴	۹	سفید	رشته ای کم تراکم	رشد هم هوایی دارد	–	۵,۵۰
۰۸	۱۱	سفید	رشته ای کم تارکم	رشد هم هوایی دارد	–	۵,۴۵
۱۱	۱۰	سفید	پنبه ای پرتراکم	رشد هم هوایی دارد	–	۵,۸
۱۳	۹	سفید	رشته ای- یکنواخت	رشد هم هوایی دارد	–	۶,۳
۱۷	۱۱	سفید	پنبه ای پرتراکم	رشد هم هوایی دارد	–	۳,۸
۶۵	۹	سفید	پنبه ای پر تراکم	رشد هم هوایی دارد	–	۴,۸۰

آزمون میوه دهی در پتری‌دیش

در قارچ‌های هموتال، هر اسپور پس از تندش تولید هیف و در نهایت تولید میسلیوم مونوکاریون می‌کند. واحدهای سلولی در این میسلیوم تک هسته‌ای است. این میسلیوم‌ها خود عقیم هستند و نمی‌تواند اندام باردهی بوجود آورد. اگر دو هیف ناشی از دو مونوکاریون سازگار باهم آمیزش پیدا کنند میسلیومی بوجود می‌آید که سلول‌های آن هر کدام دو هسته متفاوت و سازگار دارند که به این میسلیوم دی کاریون (Dikaryon) گفته می‌شود. به این منظور جهت تشخیص نهایی هیبریدها پتری دیش‌های حاوی هیبریدهای حاصل از ایزوله‌های تک اسپور که از لحاظ موزفولوژیکی مورد بررسی قرارگرفته بودند تحت شوک سرمایی و نوری قرار گرفتند (متناوبا بین دمای4 درجه و دمای اتاق- تاریکی و نور اتاق)، و سپس از نظر میوه‌دهی مورد بررسی قرار گرفتند؛ مشاهده شد که نمونه‌ها در پتری‌دیش شروع به پین زدن کردند (عکس ۲).

عکس ۳) نتیجه حاصل از ژل آگارز دو درصد، رنگ آمیزی با استفاده از گرین ویوور انجام شد. (DK : نمونه دی کاریون تایید شده، NC : نمونه کنترل



منفی، MK :نمونه مونوکاریون، submitted DK : نمونه دی کاریون تایید شده از جهاد دانشگاهی و اعداد نام هر ایزوله)

Hybrid production of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using single spore cross

Mahin Nazeri[1], Mohammad Farsi[2], Hassan Marashi[2], Farajullah Shahriari[2], Javad Janpour[3]

1. MSc student of Ferdowsi university of Mashhad
2. Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University of Mashhad
3. Department of Biotechnology, Industrial Fungi, Khorasan Razavi University Jihad

Abstract

High production and quality are always one of the main purpose in agricultural productions, without a doubt it's true in mushrooms. Development and improvement of edible mushroom's strains has to be considered nowadays, because of their impotency in health benefits for humankind, reduction of unemployment in every country, and help to the poverty. For all these purposes in this study a cap of *Pleurotus ostreatus* was prepared and about 60 single spore isolates were selected. The isolates were grown and the morphological and microscopically characteristics, such as growth rate, growth type, presence or absence of clamp connection and finally fruiting test in petri dishes was checked to identity of best isolates. Then we cross the best ones and achieved hybrids with the better characteristics. In subsequent experiments, the performance of hybrid hybrids in cultivators under the standard conditions will be investigated.

Keywords: Clamp connection, Hybrid, *pleourotus ostreatus*

References

1. **Busse, F.w., (1920)** Impfversuche mit dem Austernpilz (*Agaricus ostreatus*). Z. Forst u. Jagdwesen 52, 360-365
2. **Gaita ´n-Herna ´ndez, R., Salmones, D., 1999**. Ana ´lisis de la produccio ´ n de cepas de *Pleurotus djamor*. Rev. Mex. Mic. 15, 115–118.
3. **Kerrigan RW, Baller LM, Horgen PA, Anderson JB (1992)**. Strategies for the efficient recovery of *Agaricus bisporus* homokaryons. Mycologia 84: 575-579.
4. **Petersen, R.H., D. Bermudes, 1992**.Panellusstypticus. Geographically separated interbreeding populations,Mycologia, 84: 209-213.
5. **Rühl M, Fischer Ch, Kües U., (2008)** Ligninolytic enzyme activities alternate with mushrooms production during industrial cultivation of *Pleurotus ostreatus* on wheat-straw-based substrate. Curr Trends Biotechnol Pharm 4:478–492