پنجمین کنگره بین المللی و هفدهمین کنگره ملی ژنتیک ایران
5th International & 17th Iranian Genetics Congress
I.G.S.
انجمن ژنتیک ایران
Iranian Genetics Society
GC17-02230112

تولید نژاد کم اسپور در قارچ صدفی Pleurotus ostreatus با استفاده از موتاسیون

Production of low spore race in Pleurotus ostreatus using mutation

فیض الهی،ز.[1*]؛فارسی،م.[2]؛ملک زاده شفارودی،س.[3]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه فردوسی مشهد elmirafeizi74@gmail.com.

۲-استاد، گروه بیوتکنولوژی وبه نژادی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی وبه نژادی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) دومین قارچ خوراکی کشت شده در سراسر جهان پس از قارچ دکمه‌ای است. یکی از مشکلات عمده درکشت قارچ صدفی (*P. ostreatus*) تولید تعداد زیادی اسپور است که باعث ایجاد مباحث جدی در پرورش قارچ-های خوراکی می‌شود. این اسپورها باعث ایجاد بیماری‌های ریوی، می‌شوند. علاوه بر این اسپورهای فراوانی که منتشر می‌شوند منجر به مشکلات مختلف دیگری مانند آسیب به تاسیسات تولید، مسدودشدن فیلترها می‌شوند. این تحقیق به منظور بررسی امکان تولید نژادهای کم اسپور در قارچ صدفی *Pleurotus ostreatus* با استفاده از موتاژن فیزیکی (نور UV) انجام شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل با سه تکرار، در پنج سطح مدت تابش (۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ min) و دو سطح (۱۰، ۶۰ cm) اجرا شد. بین ۵۱۲، تک اسپور جداشده تلاقی صورت گرفت. پس از ارزیابی ۵۰ تلاقی انتخاب و در ۲ تکرار میوه حاصل از آنها مورد بررسی قرار گرفت. تغییرات میزان اسپور دهی با گرفتن طرح اسپور از قارچ ها انجام شد. نمونه‌های با میزان اسپور کم از طریق شمارش تعداد اسپور با لام هموسایتومتر با نمونه شاهد ارزیابی شدند. کمترین میزان اسپور دهی مربوط به تیمار های ۳۰min در دو فاصله ۱۰، ۶۰ cm بودند.

واژه‌های کلیدی: قارچ صدفی، کم اسپور

مقدمه

قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) دومین قارچ خوراکی کشت شده در سرار جهان پس از قارچ دکمه‌ای است. که ۳۰ درصد از تولید جهانی قارچ را به خود اختصاص داده است. تولید قارچ تنها شغلی است که تولید مواد غذایی غنی از پروتئین همراه با کاهش آلودگی محیط زیست را تضمین میکند. پسماند محیط کشت قارچ صدفی به عنوان یک کود با تهویه مطبوع برای رشد گیاهان کاربرد دارد ((Brenneman and Guttman 1994. بنابراین کشت قارچ صدفی میتواند یکی از مهمترین مشکلات در دفع زباله های خاک، را حل کند و باعث سود اقتصادی و حفاظت از محیط زیست شود. قارچ صدفی *(P.ostreatus)* غنی از ویتامین B_1 ،B_2 و ویتامین C و ویتامین D_2 است ((Manzi et al. 2004. همچنین دارای ترکیبات بسیار مهمی از جمله مس، آهن، پتاسیم، منیزیم، فسفر و روی است که مقدار پتاسیم از همه موارد مذکور بیشتر است ((Vetter 1994; Watanabe et al. 1994. با توجه به ترکیبات موجود در قارچ آنها دارای خاصیت آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی، ضد میکروبی، ضد دیابت، ضد کلسترول و بالا برنده ایمنی بدن هستند ((Cohen, Persky, and Hadar 2002; Bobek and Galbavy 2001) . در هر ۱۰۰ گرم میوه خشک از ۱۷ تا ۴۲ گرم پروتئین گزارش شده است ((Akyüz and Kirbağ 2010; Alam et al. 2008. که نشان دهنده اهمییت قارچ و ارزش سرمایه گذاری و تحقیقات روی آن است. قارچ صدفی (*P. ostreatus*) جنس ژیمنوکارپ از قارچ است، یعنی تولید هاگ زود شروع می‌شود و به‌صورت مداوم اسپورهایی را در مجاورت خود آزاد می‌کند که باعث ایجاد حساسیت‌های تنفسی مختلف می‌شود. میزان تولید اسپور در روز چند صد میلیون اسپور در هر گرم از بافت قارچ صدفی است (Baars and Van Griensven 2000). ابه عنوان یکی از نمونه‌ها پرورش دهندگان قارچ پس از استنشاق اسپورهای پراکنده به یک بیماری آلرژیک ریوی مبتلا می‌شوند ((Hausen 1974; Horner et al. 1988 . همچنین استنشاق اسپور ها باعث تب یونجه با علائم مشابه آلوئولیت آلرژیک بیرونی میشود ((Daba et al. 2008. شدت پاسخ آلرژیک ممکن است از فردی به فرد دیگر متفاوت باشد مانند خستگی عمومی، سر درد خفیف، سرفه، مشکل خفیف در تنفس، درد در اندام و غیره ((Kurup et al. 1987. علاوه بر این اسپورهای فراوانی که منتشر می‌شوند منجر به مشکالت مختلف دیگری مانند آسیب به تاسیسات تولید، مسدودشدن فیلترها و کاهش ارزش تجاری (به دلیل چسبیدن اسپور به بدن میوه) و فاسد شدن محصول میشود.تا کنون، سویه های جهش یافته با اسپور کم در بازیدیومیست‌های خوراکی که به طور طبیعی جهش یافته‌اند (Ohira 1979; Kaneko 2000; Hasebe, Murakami, and Tsuneda 1991). و به طور مصنوعی جهش یافته‌اند(Baars and Van Griensven 2000; Pandey and Ravishankar 2010; El-Fallal, El-Sayed, and El-Gharabawy 2013). و پس از ارزیابی سویه‌های فاقد اسپور برای کشت تجاری استفاده می‌شوند((Yoneyama et al. 2017. دراین مطالعه ما جهش را با تابش اشعه ماوراء بنفش به اسپور های کشت شده قبل از جوانه زنی ایجاد کردیم و میزان اسپور زایی به میزان قابل ۷۸% نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت.

مواد و روش ها

کمپوست قارچ صدفی گونه فلوریدا از شرکت قارچ بستر توس تهیه گردید.

پرتو تابی با نور UV

از نمونه شاهد تجاری چاپ اسپور تهیه شد. با استفاده از آب استریل شده سوسپانسیون رقیق اسپور تهیه شد و پس از کشت روی محیط PDA به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. پتری های حاوی کشت اسپور در پنج سطح مدت تابش (۳۰ min، ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰) و دو سطح فاصله از منبع تابش (۶۰ cm، ۱۰) در معرض اشعه UV قرار گرفتند. پتری‌های اشعه دیده، در تاریکی در دمای ۲±۲۳ به مدت ۱۰-۸ روز انکوبه شدند.

پرورش قارچ

کشت قارچ در سالن قارچ دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهدانجام شد.

اسپان با استفاده از دانه های گندم گچ و کربنات کلسیم تهیه شد که با کشت های PDA کاملا رشد یافته تلقیح شد، سپس در دمای ۲٤ به مدت دو هفته در تاریکی انکوبه شد. بستر با براده چوب، که یک شب در آب خیسانده شد، گندم پخته شده، گچ و کربنات کلسیم تهیه شد. داخل کیسه های پلاستیکی ریخته شد و در اتوکلاو به مدت دو ساعت پاستوریزه شد. پس از سرد شدن کیسه ها مایه زنی انجام شد وکیسه ها در دمای ۲٤ به مدت دو هفته در تاریکی انکوبه شد. پس از سفید شدن کیسه ها، سوراخ های کوچکی در اطراف کیسه ایجاد شد تا هوادهی ایجاد شود و رطوبت نسبی ۷۰-۸۵% با استفاده از دستگاه بخور و آبپاشی کف دو بار در روز حفظ شد. میوه ها روزانه برداشت شدند و سپس برای مقایسه اسپوردهی مورد استفاده قرار گرفتند.

مقایسه اسپور دهی

تولید اسپور توسط چاپ اسپور مشاهده شد. قارچ ها روی مقوای مشکی به مدت ۲٤ ساعت قرار دادهشد. مقایسه چاپ اسپور با نمونه شاهد انجام شد.

نمونه های منتخب به صورت میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند(۱سانتی متر از هر بدن میوه به صورت جداگانه در حجم مشخصی از آب مقطر استریل به مدت ۱۵ دقیقه معلق شد. تعداداسپور با استفاده از هموسایتومتر شمارش شد. ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور روی هموسایتو متر قرار گرفت). تعداد کل هاگ ها با فرمول زیر محاسبه شد :

$$\text{اسپور}/_{cm} = \text{تعداد کل سلول ها در مربع 25} \times 10000$$

نتایج و بحث

نمونه های 62A, 82A, 92D, 102B و 108B هیچ میوه‌ای تولید نکردند. طبق جدول شماره یک ۱۱% از تیمار ها مانند نمونه شاهد اسپور خیلی زیادی تولید کردند، ۲۶،۶% از تیمار ها دارای اسپوردهی زیاد بودند، اما نسبت به نمونه شاهد میزان اسپور دهی آنها کمتر بود. ۵۳،۳% از نمونه ها نیز اسپور دهی متوسطی را نشان دادند، در این حالت اسپور دهی تقریبا نصف نمونه شاهد است.

۶،۶% از تیمار ها اسپور دهی کمی را نشان دادند، که تولید اسپور ۷۸،۲% نسبت به نمونه شاهد کاهش پیداکرده.

شماره	مدت تابش(S)	فاصله از منبع(cm)	میزان اسپوردهی

شاهد	0	0	خیلی زیاد
19A	10	10	کم
25A	15	60	متوسط
33A	15	60	متوسط
38A	15	60	زیاد
128A	15	60	متوسط
43A	15	10	متوسط
52A	20	60	زیاد
67A	20	10	متوسط
82B	25	60	متوسط
84A	25	60	زیاد
92A	25	10	متوسط
92B	25	10	متوسط
92C	25	10	خیلی زیاد
94A	25	10	خیلی زیاد
94B	25	10	زیاد
94C	25	10	متوسط
94D	25	10	زیاد
95A	25	10	متوسط
95B	25	10	متوسط
95C	25	10	زیاد
96A	25	10	خیلی زیاد

96B	25	10	متوسط
96C	25	10	خیلی زیاد
97A	25	10	متوسط
97B	25	10	متوسط
97C	25	10	متوسط
98A	25	10	متوسط
98B	25	10	متوسط
101A	25	10	زیاد
130A	25	10	زیاد
102A	30	60	زیاد
102C	30	60	کم
103A	30	60	متوسط
103B	30	60	متوسط
103C	30	60	متوسط
105A	30	60	متوسط
108A	30	60	زیاد
110A	30	60	متوسط
110B	30	60	زیاد
114A	30	10	زیاد
117A	30	10	کم
117B	30	10	زیاد
122A	30	10	متوسط

122B	30	10	متوسط

تاثیر مدت زمان تابش بر میزان اسپور دهی

دو نمونه از هر تیمار انتخاب شد و تعداد اسپور آن توسط لام هموسایتو متر اندازه‌گیری شد. با توجه به نمودار شماره ۱ کاهش میزان اسپور به صورت تصادفی اتفاق افتاده است و در دو تیمار ۱۰ و ۳۰ دقیقه سه نمونه با اسپوردهی کم و در ۲۵ دقیقه شاهد نمونه ای با اسپور دهی خیلی زیاد حتی بیشتر از نمونه شاهد داریم

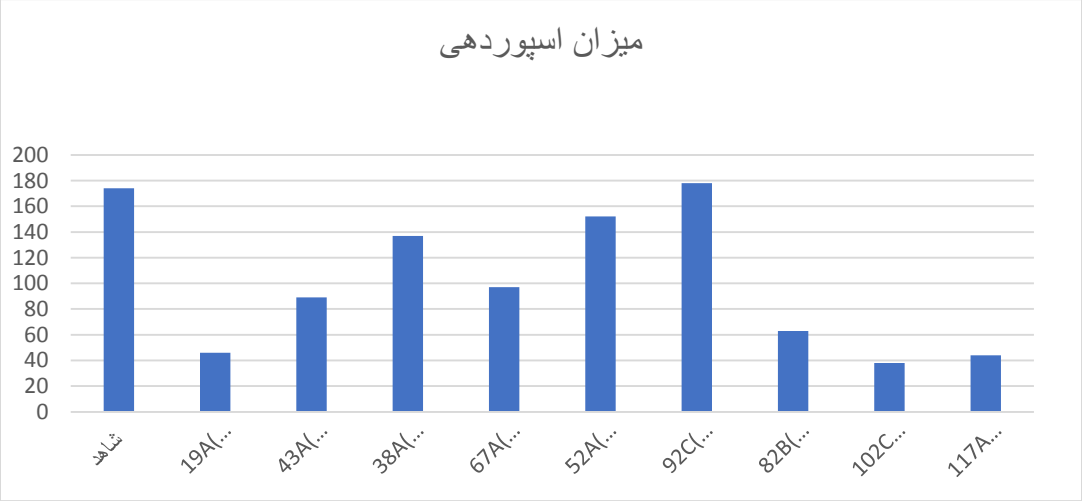
تاثیر فاصله از منبع بر میزان اسپور دهی

میزان اسپور دهی بین تیمار هایی که مدت زمان تابش یکسانی داشتند کاملا تصادفی بوده به‌طوری که میزان اسپور دهی دو نمونهدر زمان تابش ۳۰ دقیقه اسپور کمی تولید کردند اما میزان اسپور نمونه ای که ۶۰ سانتی متر از منبع فاصله داشته از میزان اسپوردهی نمونه ای که در ۱۰ سانتی متری منبع بوده است، کم تر است

نام	میزان اسپوردهی
شاهد	174×10^4
19A(10min,10cm)	46×10^4
43A(15min,10cm)	89×10^4
38A(15min,60cm)	137×10^4
67A(20min,10cm)	97×10^4
52A(20min,60cm)	152×10^4
92C(25min,10cm)	178×10^4

63×10^4	82B(25min,60cm)
38×10^4	102C(30min,60cm)
44×10^4	117A(30min,10cm)

میزان اسپور دهی بین تیمار هایی که مدت زمان تابش یکسانی داشتند کاملا تصادفی بوده به‌طوری که میزان اسپور دهی دو نمونهدر زمان تابش ۳۰ دقیقه اسپور کمی تولید کردند اما میزان اسپور نمونه ای که ۶۰ سانتی متر از منبع فاصله داشته از میزان اسپوردهی نمونه ای که در ۱۰ سانتی متری منبع بوده است، کم تر است



نتیجه‌گیری

هر چند ایجاد موتاسیون و ظهور قارچ هایی با اسپور کم تر تصادفی است اما می‌توان گفت هر چه مدت زمان تابش اشعه بیشتر میشود فراوانی میوه‌هایی با اسپور کم تر بیش تر میشود و همچنین مدت زمان تابش از فاصله از منبع تابش موثر تر است.

Akyüz, M, and S Kirbağ. 2010. 'Nutritive value of wild edible and cultured mushrooms [Yenen yabani ve kültür mantarlarin besin değerleri]'.

Alam, Nuhu, Ruhul Amin, Asaduzzaman Khan, Ismot Ara, Mi Ja Shim, Min Woong Lee, and Tae Soo Lee. 2008. 'Nutritional analysis of cultivated mushrooms in Bangladesh–Pleurotus ostreatus, Pleurotus sajor-caju, Pleurotus florida and Calocybe indica', *Mycobiology*, 36: 228-32.

Baars, JJP, and JLD Van Griensven. 2000. "Development of a sporeless strain of oyster mushroom Pleurotus." In *Science and Cultivation of Edible Fungi: Proceedings of the 15th International Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi, Maastricht/Netherlands/15-19 May 2000*, 317. AA Balkema.

Bobek, P, and S Galbavy. 2001. 'Effect of pleuran (beta-glucan from Pleurotus ostreatus) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine-induced precancerous lesions in rat colon', *British journal of biomedical science*, 58: 164.

Brenneman, James A, and Mark C Guttman. 1994. 'The Edibility & Cultivation of the Oyster Mushroom', *The American Biology Teacher*: 291-93.

Cohen, R, L Persky, and Y Hadar. 2002. 'Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus Pleurotus', *Applied microbiology and biotechnology*, ۵۸: ۵۸۲-۹۴.

Daba, Ayman S, SS Kabeil, William A Botros, and MA El-Saadani. 2008. 'Production of mushroom (Pleurotus ostreatus) in Egypt as a source of nutritional and medicinal food', *World J. Agric. Sci*, 4: 630-34.

El-Fallal, AA, AKA El-Sayed, and HM El-Gharabawy. 2013. "Induction of low sporulating-UV mutant of oyster mushroom with high content of vitamin D2." In *3rd International conference on biotechnology and its application in botany and microbiology*, 17-18.

Hasebe, Kozaburo, Shigeyuki Murakami, and Akihiko Tsuneda. 1991. 'Cytology and genetics of a sporeless mutant of Lentinus edodes', *Mycologia*, 83: 354-59.

Hausen, BM. 1974. 'Allergic disease caused by the spores of an edible fungus *Pleurotus florida*', *Mushroom Sci.*, 9: 219-25.

Horner, W Elliot, MD Ibanez, V Liengswangwong, JE Salvaggio, and SB Lehrer. 1988. 'Characterization of allergens from spores of the oyster mushroom, Pleurotus ostreatus', *Journal of allergy and clinical immunology*, 82: 978-86.

Kaneko, S. 2000. "Cultivation of Pholiota adiposa sporeless strain." In *Transact Meeting Kyusyu Branch Jpn For Soc*, 157-58.

Kurup, VP, RA Mäntyjärvi, EO Terho, TH Ojanen, and JH Kalbfleisch. 1987. 'Circulating IgG antibodies against fungal and actinomycete antigens in the sera of farmer's lung patients from different countries', *Mycopathologia*, 98: 91-99.

Manzi, Pamela, Stefania Marconi, Altero Aguzzi, and Laura Pizzoferrato. 2004. 'Commercial mushrooms: nutritional quality and effect of cooking', *Food chemistry*, 84: 201-06.

Ohira, I. 1979. 'Sporulation-deficient mutant in Pleurotus pulmonarius Fr.[Basidiomycota, Hymenomycetidae, Agaricales]', *Transactions of the Mycological Society of Japan*.

Pandey, Meera, and Sandhya Ravishankar. 2010. 'Development of sporeless and low-spored mutants of edible mushroom for alleviating respiratory allergies', *Current Science*: 1449-53.

Vetter, János. 1994. 'Mineral elements in the important cultivated mushrooms Agaricus bisporus and Pleurotus ostreatus', *Food chemistry*, 50: 277-79.

Watanabe, Tomoko, Noboru Tsuchihashi, Yuriko Takai, Kyoshi TANAKA, and Akira Suzuki. 1994. 'Effects of ozone exposure during cultivation of oyster mushroom (Pleurotus ostreatus) on chemical components of the fruit bodies', *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41: 705-08.

Yoneyama, S, N Ando, T Azuma, M Sato, S Ushijima, and T Matsumoto. 2017. 'Genetic and cytological analysis of asporulation-deficient (sporeless) mutant of Pleurotus cornucopiae var. citrinopileatus induced by UV irradiation', *Jpn. J. Mycology*, 58: 41-50.