

می گردد (۱۳).

در بهبود ژنتیکی برون نژادی، هدف اصلی در واقع گرد هم آوردن ژنهای مطلوب از نژادهای مختلف و تولید یک نژاد جدید با ترکیبی از خصوصیات چند نژاد می باشد. تولید و تأیید هموکاریونها و همچنین تشخیص و تأیید هیریدهای از جمله مهمترین مشکلات این روش می باشد. حل این مشکلات به روشهای سنتی و روشهای جدید صورت می گیرد. در روش سنتی، هموکاریونها از طریق مشخصات مورفوЛОژیکی کشت تک اسپورها تا حدودی مشخص می شوند و سپس در صورت عدم باردهی تأیید می شوند. بعد از انجام هیریداسیون، هیریدهای نیز از طریق برخی مشخصات مورفوLOژیکی تا اندازه ای مشخص و سپس از طریق آزمون میوه دهی تأیید می شوند (۱۰). روش سنتی با معایی همراه است. از جمله آنکه اولاً هنوز هیچ نشانگر مورفوLOژیکی قطعی برای شناخت هموکاریونها پیدا نشده است و ثانیاً باردهی محدودی در برخی هموکاریونها دیده می شود. علاوه بر این گاهی اوقات عواملی که تا حدودی ناشناخته می باشند، بر میوه دهی هتروکاریونها تأثیر منفی می گذارند (۶).

امروزه مثل همه روشهای به نژادی دیگر از نشانگرهای مولکولی برای اصلاح این قارچ استفاده می کنند (۱۶). در روش استفاده از RAPD به عنوان یکی از روشهای نوین مولکولی، ایزولهای مختلف تک اسپوری و هموکاریونها به کار رفته در هیریداسیون، تنوع محسوسی در تعداد مکانهای ژنی تکثیر یافته نشان می دهد. این روش برای شناخت هموکاریون و یا هتروکاریون بودن تک اسپورهای جدا شده به کار می رود. اصولاً ایزولهای تک اسپوری که هموکاریون هستند به نحو محسوسی در چندی مکان ژنی فاقد باندهای RAPD می باشند ولی ایزولهایی که هتروکاریون هستند یا هیریدهایی که از دو هموکاریون ناجور به وجود آمده اند در مقایسه با مجموع باندهایی که تمام ایزولهای نشان می دهنند، تمام یا اغلب باندها را دارا هستند (۹ و ۱۰). یکی از معایب استفاده از نشانگرهای RAPD، آن است که گاهی اوقات آللها نول باعث می شوند که تکثیر در برخی مکانهای ژنی دیده نشود (۶). در هر صورت، برای تشخیص هموکاریونها، بهتر است تلفیقی از روشهای سنتی و جدید به کار برده شود (هورگن، مکاتبات شخصی). در این تحقیق کشت تک اسپورها تهیه و تنوع بازید یوسپورها در محیط کشت جامد، اسپاون و آزمون میوه دهی مورد بررسی قرار

قارچ فقدان یک بازید یوسپور تک هسته ای یا هموکاریون در خلال چرخه زندگی آن می باشد (۳). با وجود این بنا بر گزارش های متعدد (۲، ۴ و ۵) بازید یوسپورهایی با یک هسته هاپلوبیتد با فراوانی کم از یک تا ده درصد به وجود می آید. مشکل دیگر در اصلاح این قارچ تندش بسیار ضعیف و ناهمانگ بازید یوسپورها است که گام اول در یک برنامه اصلاحی به شمار می آید و همواره محققین مختلف به آن اشاره داشته اند. در سال ۱۹۸۹ با آزمایش مشهوری که هورگن و همکاران برای درک هر چه بیشتر سینتیک تندش بازید یوسپورها انجام دادند، راه حل هایی برای برطرف کردن مشکلات فوق ارائه نمودند (۴).

مشکل مهم دیگر برای اصلاح این قارچ از طریق استفاده از اسپورها، گندزدایی کردن اسپورها است بطوریکه آلودگی های شدید باکتریایی مانع از تندش اسپورها می شود و قبل از اینکه اسپورها فرصت تندش پیدا نمایند محیط غذایی توسط باکتریها اشغال می شود.

یکی از دلایل عملکرد پایین این قارچ در ایران (۷ کیلو گرم در مقایسه با 18 ± 2 کیلو گرم در متر مربع عملکرد جهانی)، نامرغوب بودن اسپاونهای وارداتی و گرفتن زیر کشتهای مکرر از این اسپاونها می باشد که باعث تضعیف اسپاونهای مورد استفاده توسط شرکتهای پرورش دهنده می شود (اظهارات شرکتهای پرورش دهنده قارچ).

به منظور تولید اسپاونهای مرغوب و افزایش عملکرد در واحد سطح که رفع وابستگی به خارج از کشور و کاهش هزینه تولید را به دنبال خواهد داشت، تحقیق در این زمینه را شروع نمودیم.

اصولاً اصلاح این قارچ مثل سایر گیاهان زراعی با استفاده از بهبود ژنتیکی درون نژادی یا گرینش بدون دورگ دورگ گیری و بهبود ژنتیکی برون نژاد از طریق تولید دورگ با استفاده از هیریداسیون صورت می گیرد (۱۰).

برای بهبود ژنتیکی درون نژادی معمولاً از تنوع تک اسپورها از نظر سرعت رشد، تیپ پرگنه، عملکرد و ... استفاده می شود. در استفاده از تنوع تک اسپورها فقط ایزولهایی که پرگنه آنها به صورت رشته ای است و سریع رشد می کنند، گرینش شده و از آنها اسپاون تهیه می شود. سپس آزمایش های میوه دهی برای ارزیابی دقیق خصوصیات تک اسپورهای جدا شده انجام

گرمخانه با دمای 25°C منتقل شدند و اجازه داده شد تا پرگنه هر کدام از اسپورها به طور کامل رشد کند. سپس محل تشکیل هر پرگنه علامت گذاری شد. پس از قابل رویت بودن پرگنه ها با چشم غیر مسلح، آنها را به کمک یک سوزن نوک پهن به ظروف پتري حاوی محیط کشت تازه انتقال داده و در گرمخانه با درجه حرارت 25°C نگهداری شدند. برای بدست آوردن کشت چند اسپوری اجازه داده شد تا اسپورها تندش کرده و پرگنه آنها با یکدیگر مخلوط شوند. در کشت چند اسپوری به دلیل عدم نیاز به مشاهدات میکروسکوپی برای تندش بازید یوسپورها، بر عکس کشت تک اسپوری، برای تندش اسپورها از وضعیت تحریکی استفاده شد.^(۴).

برای تولید هیبرید، دو ریز نمونه هر یک به قطر نیم سانتی متر از حاشیه هر یک از پرگنه ها در کشت تک اسپوری هموکاریون، به صورت متقابل به دو طرف ظرف پتري حاوی محیط کشت تازه PDA با فاصله یک سانتی متر از یکدیگر منتقل شدند. پس اینکه هیفه های دو ایزوله به هم متصل شده و کاملاً یکدیگر را پوشاندند، سه زیر کشت هر یک به قطر ۲ میلی متر از این ناحیه گرفته شد. این زیر کشتها به ظروف پتري حاوی محیط کشت تازه منتقل و در یک ردیف با فواصل مساوی از هم قرار داده شدند. سپس یک زیر کشت از هر یک از دو ایزوله والدی تهیه و در یک ردیف عمود بر ردیف سه زیر نمونه قبلی کشت شد. بر اساس میزان رشد پرگنه های حاصل از تلاقی، بهترین پرگنه ها در هر ظرف پتري انتخاب، و از انتهاي ترین قسمت آنها که رشد رشته ای و سریع داشتند، ریز نمونه ای گرفته و به ظروف پتري جدید منتقل شدند. پس از پرسدن ظروف پتري از هیفه های هیبرید، اسپاون هیبرید تهیه گردید.

برای تهیه اسپاون از کشتها تک و چند اسپوری به ازء هر یک کیلو گرم گندم، $1/8$ لیتر آب اضافه شد و به مدت 20 دقیقه جوشانیده شده و دانه های گندم جوشیده در داخل آب گرم به مدت 10 دقیقه باقی ماندند. بعد از اینکه دانه های گندم سرد شدند و آب اضافی آنها تبخیر شد، به ازای هر یک کیلو گرم گندم مقدار 12 گرم سولفات کلسیم هیدراته و 3 گرم کربنات کلسیم اضافه شد. از این مخلوط حدود 100 گرم به داخل شیشه های

گرفت. علاوه بر این جهت استفاده از بهبود ژنتیکی برون نژادی، از بازید یوسپورهایی که در آزمون میوه دهی، هموکاریون بودن آنها تا حدود زیادی به اثبات رسیده بود، در تلاقی های بین هموکاریونهای نژادهای متفاوت استفاده شد.

مواد و روش ها

نژادهای مورد استفاده عبارت بودند از MC395, MC392, MC378, MC377, MC371, A130, A15 نژادهای A15 و A130 به صورت کلاهک تازه از پرورش دهنده گان قارچ در ایران تهیه شد و شش نژاد دیگر از کلکسیون قارچهای خوراکی دانشگاه ایالتی پنسیلوانیا آمریکا دریافت شد. سه نژاد MC371, MC370 و MC395 هیبرید کرم سفید رنگ و سه نژاد MC392, MC378, MC377 هیبرید کرم رنگ بودند. ابتدا یک عدد قارچ متوسط تازه موقعی که پرده زیر کلاهک آن به شدت کشیده شده بود، انتخاب و قسمت پایه آن قطع و کلاهک تمیز شد. سپس پرده زیر کلاهک با چاقوی جراحی حذف و کلاهک گندزدایی شده روی کاغذ صافی در ظرف پتري قرار داده شد. نیمه دیگر ظرف پتري روی کلاهک قرار گرفته و ظرف پتري در تاریکی در درجه حرارت 21°C قرار داده شد. پس از گرفتن نقش اسپورها یک مایع تعیقی غلظت از اسپورها تهیه و حدود $75/0$ میلی لیتر از آن در لوله های 2 میلی لیتری ریخته شد. به همین حجم به درون هر لوله هیپوکلریست سدیم 1% اضافه شد. مایع های تعیقی به مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با آب مقطر گندزدایی شده، شستشو داده شدند. از این مایع های تعیقی برای کشت اسپورها در محیط جامع CYM^۱ و PDA^۲ استفاده شد. برای برطرف کردن آلودگی، به داخل شیشه های ارلن مایر حاوی محیط کشت پس از اتوکلاو کردن، 25 میکرو گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین اضافه شد. برای تنظیم تراکم 80000 اسپور در هر میلی لیتر مایع تعیقی از هموسایوتومتر استفاده شد. حدود 15000 اسپور در هر ظرف پتري استاندارد با قطر 10 سانتی متر حاوی محیط کشت PDA یا CYM متنقل گردید. پس از انتقال اسپورهای محیط کشت جامد، ظروف پتري به

و هر ۱۰۰ میلی لیتر بافر دارای: ۱: Tris-HCL, pH.8 (۱ مولار) میلی لیتر ۲: EDTA-NaOH, pH.8 (نیم مولار) ۰/۲ میلی لیتر آب مقطر گندزدایی شده: ۹۸/۸ میلی لیتر بود. پس از آماده شدن محلول نهایی DNA، ۶ میکرولیتر از محلول هر لوله به یک لوله ۲ میلی لیتری گندزدایی شده منتقل شد. نمونه نهایی برای انجام PCR به طریق زیر تهیه گردید.

- ۱ ۶ میکرولیتر از نمونه استخراج شده
- ۲ محلول dNTPs (۲۰۰ میکرومول)
- ۳ بافر PCR، ۲/۵ میکرولیتر
- ۴ MgCl₂ (۲ میلی مول)
- ۵ آغازگر (۵ پیکو مول)
- ۶ آنزیم تک پلیمر از (یک واحد)
- ۷ رونغن معدنی (۲۵ میکرولیتر)

-۵ آغازگر مورد استفاده دارای توالی TGTAGCAGGG-۶ بود. نمونه های آماده شده به دستگاه سیکل حرارتی مدل Maxi Gene منتقل شدند. برنامه حرارتی هر سیکل به صورت ۹۲ ° به مدت یک دقیقه ۳۶ ° به مدت یک دقیقه ۷۲ ° به مدت دو دقیقه برای تعداد ۴۵ سیکل تنظیم شد، بعد از خاتمه PCR، ۱۰ میکرولیتر از بافر رانش به هر لوله اضافه شد. سپس نمونه ها در دستگاه الکتروفورز با ژل آگاریک درصد، ولتاژ ۷۸ و ۴۳ میلی آمپر به مدت ۵ ساعت قرار گرفتند. بعد از پایان الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل در اتیدیوم بروماید به مدت یک ساعت انجام شد. سپس ژل، پس از شستشو با آب، جهت رویت باندها و عکسبرداری به دستگاه Transilluminator UV منتقل شد.

نتایج و بحث

روشهای متعددی برای افزایش پتانسیل ژنتیکی عملکرد قارچ خوارکی تکمیلی ای سفید وجود دارد. این روشها شامل تهیه اسپاون با استفاده از کشت بافت قارچهای با وزن بالا و ظاهری مطلوب، تهیه اسپاون با استفاده از اختلاط نزادهای مطلوب مختلف و یا بهره گیری از خاصیت هتروزیس با استفاده از تولید اسپاون هیرید می باشد. مشکل اساسی در تولید اسپاون هیرید، تندش کند اسپورها، رفع آلدگی باکتریایی و شناساسی ایزووله های تک هسته ای است. در این آزمایشها که به مدت ۲۰ ماه طول کشید با

ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری منتقل گشت. مقدار ۵۰ میلی لیتر آب مقطر گندزدایی شده نیز به داخل هر ظرف اضافه شد جهت گندزدایی، دانه های گندم به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت ۲۱ ° و فشار دو اتمسفر اتوکلاو شدند. بعد از سرد شدن به درجه حرارت ۲۷ ° قطعه ای از پرگنه کشت تک اسپور هرایزوله به قطر تقریبی یک سانتی متر به دانه های گندم منتقل شد. بعد از انتقال، ظروف به گرمخانه با درجه حرارت ۲۳±۱ ° C منتقل شدند.

جهت انجام آزمون میودهی، ابتدا بستر کشت تهیه و در اتاق پاستوریزاسیون ضد عفونی شد (۱). سپس موقعی که درجه حرارت بستر کشت به ۲۷ ° C کاهش یافت، در هر کیسه ۵ کیلوگرم حدود ۳ کیلوگرم بستر کشت ریخته و با ایزوله مورد نظر، مایه زنی انجام شد. از هر تیمار دو تکرار و در مجموع ۲۰۰ کیسه پس از تلقیح به صورت کاملاً تصادفی در ارتفاع ۳۰ سانتی متری کف اتاق در بالای جعبه های حمل گوجه فرنگی که به صورت معکوس خوابانیده شده بودند، مرتب شدند. گسترش شبکه میلیومی فارج در درجه حرارت ۲۳ ° و رطوبت نسبی ۸۰٪ انجام شد. پس از ۱۲ روز از تلقیح که میسلیوم ها در اثر رشد به سطح بستر کشت رسیدند، خاک دهی انجام شد (۱۳). پس از اینکه میسلیوم ها سطح شوک حرارتی صورت گرفت (۲، ۱). سپس درجه حرارت در ۱۸ ° و رطوبت در حدود ۷۵٪ تنظیم شد. پس از حدود یک هفته اجسام تکمیلی تشکیل گردید. به مدت یک ماه و در طی سه مرحله (فلاش) قبل از اینکه کلامک قارچها باز شود برداشت انجام شد. پس از هر بار برداشت آبیاری سنگین و تهییه هوا صورت می گرفت. یادداشت برداری از تمام کیسه ها جهت بررسی میزان و چگونگی تولید اندامهای باردهی هر ایزوله انجام شد.

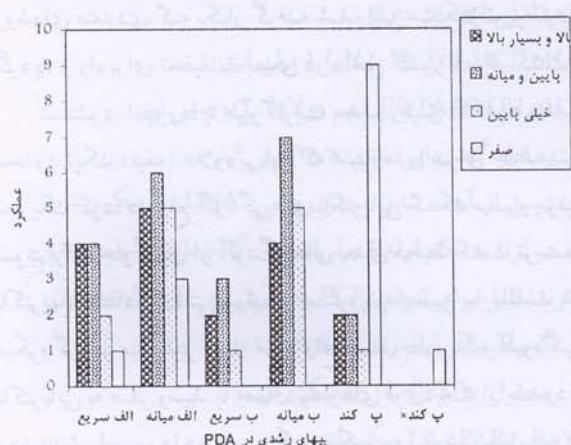
برای مطالعات نشانگرهای RAPD در بیشتر موارد از کلامک قارچ و در موارد محدودی از کشت مایع (مجیط کشت CYM) استفاده شد. ابتدا ۳-۵ گرم میسلیوم تازه انتخاب و با استفاده از نیتروژن مایع و به کمک آون چینی برای هر یک از ایزوله ها، پودر سریع خشک شده تهیه شد. استخراج DNA با استفاده از روش تغییر یافته زولان و پوکیلا صورت گرفت (۱۷). ابتدا غلظت ۲۵ نانو گرم بر میکرولیتر DNA برای هر نمونه تهیه گردید. حل کردن DNA در کلیه مراحل در بافر TE انجام شد

ایزوله‌های با عملکرد بالا و شناسایی هموکاریونها برای تولید هیف هیبریدی، حائز اهمیت می‌باشد. هموکاریونها در آزمون میوه دهی معمولاً اندام باردهی تشکیل نمی‌دهند و در صورت تشکیل، تعداد کلاهک‌ها کم و عملکرد آنها بسیار پایین خواهد بود. هنوز هیچ نشانگر مورفو‌لوژیکی قطعی برای شناخت هموکاریونها و جدا کردن آنها بدست نیامده است. با استفاده از مشاهدات آزمون میوه دهی، از ۱۰۰ ایزوله تک اسپور تعداد ۷ ایزوله به عنوان هموکاریون شناسایی شدند. در مرحله بعدی با استفاده از تلاقي این ایزوله‌ها، بذور هیبرید برونو نزاری تولید شد. تعدادی از هیبریدها از جمله هیبریدهای حاصل از تلاقي‌های بین نژادهای A130,A15,MC395 نسبت به والدین از رشد سریعتری برخوردار بودند (شکل ۵).

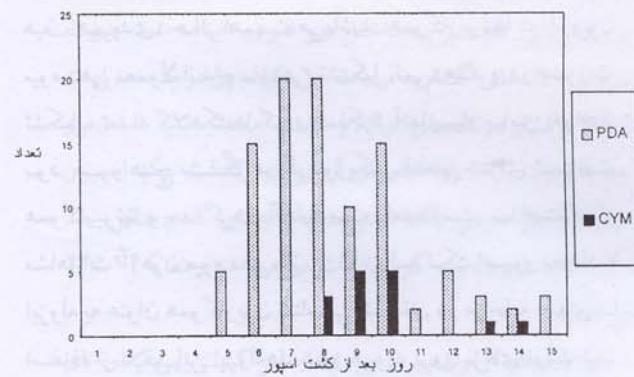
بررسی نتایج واکنشهای PCR-RAPD برای ۹ ایزوله نژاد A15، ۱۴ باند واضح بین ۱۵۰ تا ۱۴۰۰ جفت باز را نشان داد. در این ازمایش فقط ۴ باند در بین همه ایزوله‌ها مشترک بود. بنابراین چند شکلی محسوسی در بین ۹ ایزوله مورد آزمایش برای آغازگر مورد استفاده مشاهده شد. دو ایزوله شماره ۱۴ و ۶۰ بیشترین تعداد باند را داشته (جدول ۱) و در آزمون میوه دهی نیز از عملکرد بالایی برخوردار بودند. از طرف دیگر ایزوله شماره ۱۱ باداشتن فقط ۶ باند (کمترین تعداد)، از نظر عملکرد در گروه صفر قرار گرفت (شکل ۶ و جدول ۱). با توجه به یافته‌های فوق، بین میزان عملکرد ایزوله‌ها با تعداد باندهایی که با استفاده از آغازگر مورد استفاده مشاهده می‌شود، یک ارتباط مثبت و منطقی وجود دارد. در ایزوله‌های هتروکاریون که از عملکرد بالایی برخوردارند، به دلیل داشتن دو هسته متفاوت، مکانهای بیشتری برای اتصال آغازگر وجود دارد و در نتیجه قطعات بیشتری از DNA تکثیر شده و باندهای بیشتر در ژل الکتروفورز ظاهر می‌شوند. عکس این گفته در مورد ایزوله‌های هموکاریون و یا تک هسته‌ای نیز صادق است. در ایزوله‌های هموکاریون یا تک هسته‌ای، چون نسبت به هتروکاریونها از تنوع هسته‌ای کمتری برخوردار می‌باشند، مکانهای کمتری برای اتصال آغازگر وجود دارد و در نتیجه تعداد قطعات معدودتری تکثیر شده و تعداد باند کمتری ظاهر می‌شوند. البته تعداد باندهای حاصل از ایزوله‌های تک هسته‌ای و یا هموکاریونهای دو هسته‌ای به ازاء یک آغازگر بیزه، یکسان خواهد بود. دلیل این امر وجود توالی‌های یکسان در بازهای DNA های تک‌هسته‌ایها و دو هسته‌ای‌های هموکاریون

روشهای متعددی که بکار گرفته شد، این مشکلات برطرف گردید و راه برای تحقیقات بعدی در داخل کشور هموار گشت. شیستشوی اسپورها با هیپوکلریت سدیم رقیق (۱%) به مدت محدود (یک دقیقه) علاوه بر این که اسپورها را برای جوانه‌زنی تحریک کرد، در رفع آلدگی‌های باکتریایی کمک بسیار مؤثر نمود. برای جلوگیری از آلدگی‌های بعدی محیط کشت توسط باکتریها، استفاده از آنتی بیوتیک استروپتوماسین با غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر بسیار مؤثر واقع شد، بطوریکه آلدگی باکتریایی به صفر رسید. با اعمال تیمارهای فوق، بعد از حدود ۷ روز تندش اسپورها در زیر میکروسکوپ با درشت‌نمایی ۱۰۰ قابل رویت بود (شکل ۳)، و پس از ۱۲ روز پرگنه هر یک از تک اسپورها تشکیل شده بود و با چشم غیر مسلح بهوضوح دیده می‌شد. روند تشکیل پرگنه‌ها در حد فاصل ۶ تا ۱۱ روز بعد از کشت از سایر روزها بیشتر بود و اسپورها در محیط غذایی PDA بهتر از محیط غذایی CYM تندش نمودند (شکل ۱).

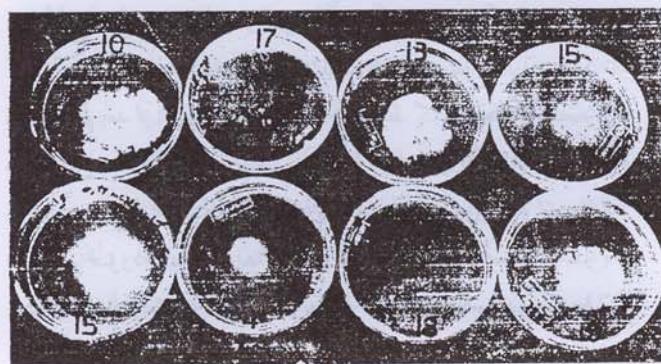
تنوع قابل ملاحظه‌ای از نظر شکل پرگنه و سرعت رشد، بین کشت‌های تک اسپوری هر نژاد مشاهده شد. این تنوع در حدود روز بیست بعد از انتقال تک اسپورها به محیط کشت جدید کاملاً محسوس بود (شکل ۴). تعدادی از ایزوله‌های تک اسپوری دارای هیف‌هایی به شکل رشته‌ای و از سرعت رشد بیشتری نسبت به بقیه برخوردار بودند ($P<1\%$). آن دسته از ایزوله‌ها که در محیط کشت جامد از رشد سریعی برخوردار بودند در محیط اسپاون گندم هم رشد رشتلهای داشتند و زودتر از بقیه که دارای رشد کنند، پنهانی یا کرکی بودند محیط اسپان را پر کردند ($P<1\%$). بر اساس مشاهدات آزمون میوه‌دهی، ایزوله‌های بdest آمده در گروههای با عملکرد بالا، متوسط، ضعیف و صفر قرار گرفتند. آن دسته از ایزوله‌ها که در محیط کشت جامد و اسپان از رشد رشتلهای و سریعی برخوردار بودند، از نظر عملکرد و تشکیل اندامهای باردهی نیز در گروههای با عملکرد بالا قرار گرفتند (شکل ۲). بنابراین می‌توان قبل از آزمون میوه‌دهی، که کاری پرهزینه و وقت‌گیر می‌باشد، بر اساس شکل هیف‌ها و میزان رشد آنها در محیط کشت جامد و اسپاون، تعداد ایزوله‌ها را کاهش داد و حجم مواد آزمایشی را کم کرد. البته این رابطه ۱۰۰٪ نیست. ایزوله‌های هموکارین دو هسته‌ای نیز ممکن است از رشد سریعی برخوردار باشند، اما در آزمون میوه دهی در گروه ضعیف و یا صفر قرار گیرند. آزمون میوه دهی از نظر شناسایی



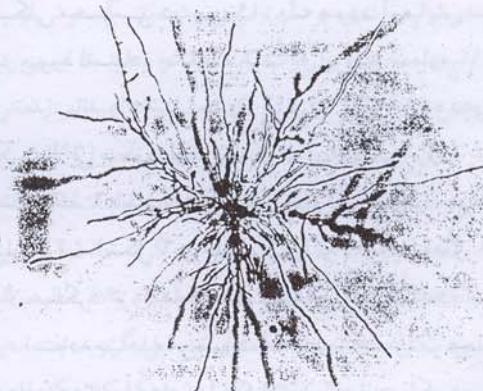
شکل ۲ - رابطه تیپ رشدی در محیط کشت جامد با عملکرد
الف: رشد رشته‌ای ب: رشد کرکی پ: تیپ فاقد میسلیوم هوایی
کند: رشد کند کند: رشد خیلی کند میانه: رشد متوسط
سریع: رشد سریع



شکل ۱ - میانگین تعداد پرگنه تشکیل شده در ایزوله‌های مختلف نژاد MC395 از زمان کشت اسپورها تا روز پانزدهم در دو محیط غذایی PDA و CYM.



شکل ۴ - تنوع بین ایزوله‌های تک اسپوری از نظر شکل پرگنه و سرعت رشد



شکل ۳ - نمای میکروسکوپی از تندش بازید یوسپورها و تشکیل پرگنه



جدول ۱ بررسی نتایج حاصل از واکنشهای PCR-RAPD برای ۹ ایزوله A15. علامت؟ مبهم بودن باند را نشان می‌دهد.

حضور تولیدات تکثیری در ایزوله ها											اندازه مکان ژنی (bp)
۲۸	۱۱	۲۰	۴۵	۶۰	۱۴	۱۷	۵۵	۴۱	۱۵-۱۴۰۰	۱۵-۲۰۱۳۰۰	
-	-	-	-	+	+	-	۱-	۱-	OPJ - ۱۵-۱۴۰۰	۱۵-۳۰۱۲۰۰	۱۵-۴۰۱۱۰۰
-	-	-	-	+	-	-	-	-	OPJ - ۱۵-۲۰۱۳۰۰	۱۵-۵۰۱۰۰۰	OPJ - ۱۵-۶۰۹۰۰
+	+	+	+	-	+	۱+	+	+	OPJ - ۱۵-۳۰۱۲۰۰	۱۵-۷۰۱۰۰	OPJ - ۱۵-۸۰۱۰
-	-	-	-	-	-	-	-	+	OPJ - ۱۵-۴۰۱۱۰۰	۱۵-۹۰۹۰۰	OPJ - ۱۵-۱۰۳۵۰
-	-	-	-	+	+	+	+	-	OPJ - ۱۵-۵۰۱۰۰۰	۱۵-۱۰۳۰۰	OPJ - ۱۵-۱۱۰۰
-	-	-	-	+	+	-	-	-	OPJ - ۱۵-۶۰۹۰۰	۱۵-۷۰۱۰۰	OPJ - ۱۵-۸۰۱۰
+	+	-	-	+	+	+	-	+	OPJ - ۱۵-۹۰۹۰۰	۱۵-۱۱۰۰	OPJ - ۱۵-۱۲۰۰
+	-	-	-	-	-	-	-	+	OPJ - ۱۵-۱۳۱۰۰	۱۵-۱۴۱۰۰	تعداد کل باندها
۱-	۱-	۱-	۱-	۱-	۱-	۱-	۱-	-	OPJ - ۱۵-۱۴۱۰۰	میزان عملکرد	میانه
۲	۶	۶	۶	۹	۱۰	۸	۷	۹			میانه پابند
											میانه پابند

با یکدیگر آناستاموز داده و نژاد دو هسته‌ای هیبریدی تولید نمایند. جهت شناسایی دقیق دو هسته‌ای های هموکاریون از تک هسته‌ای ها، در حال حاضر هیچ روشی جزء تلاقي دو به دوی آنها با یکدیگر و آزمون عملکرد هیفهای منطقه آناستاموز وجود ندارد. آزمایش عملکرد اسپاونهای هیبرید تولید شده به این روش در حال انجام می‌باشد.

می‌باشد. چون هموکاریونها عملکرد صفر و یا بسیار ضعیفی دارند (۵) و از طرفی هم تشکیل تعداد باند RAPD در آنها به طور محسوسی کمتر است، لذا می‌توان با استفاده از یک آغاز گر مناسب به گزینش و جدا کردن ایزولهای هموکاریون پرداخت (۷). جهت تولید اسپاون هیبرید فقط از هموکاریونهای تک هسته‌ای استفاده شد، چرا که این نوع ایزولهای می‌توانند به راحتی

منابع

- ۱- محمدی گل تپه، او پورجم، (۱۳۷۳)، اصول پژوهش قارچهای خوارکی، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس ۱۷۷ ص.
- 2- Chang, S. T. and P. G. Miles. 1989. Edible Mushrooms and Their Cultivation. Boca Raton, Florida, 345 pp.
- 3- Horgen, P. A. and J. B. Anderson. 1992. Biotechnology and edible mushrooms. In: "Biotechnology and Filamentous Fungi". (Eds: D. Finkelestein and C. Ball). Butter worth, Boston, pp. 447-462.
- 4- Horgen, P. A., Kokurwicz, K. F. and J. B. Anderson. 1989. The germination of basidiospores from commerical and wild collected isolates of Agaricus bisporus (= Agaricus brunnescens). Can.J. Microbiol. 35: 492-498.
- 5- Kerrigan, R.W. and I. K. Ross. 1987. Basidiospore number variation in Agaricus. In: "Cultivating Edible Fungi". (Eds: P.J. Wuest, D.J. Royse and R.B. Beelman), Elsevire Science Publishers B.V., pp. 155-162.
- 6- Kerrigan, R. W., Royer, J.C., Bailer, L. M., Horgen, P. A. and J. B. Anderson. 1992. Strategies for the efficient recovery of Agaricus bisporus homokaryons. Mycologia. 84: 575-579.
- 7- Kerrigan, R. W., Royer, J. C., Bailer, L. M., Kohli, Y., Horgen, P. A. and J. B. Anderson. 1993. Meiotic behaviour and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus Agaricus bisporus. Genetics, 133: 225-236.
- 8- Khush, R. S., Becker, E. and M. Wach. 1992 DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom Agaricus bisporus. Appl. Environ. Microbiol. 58 (19): 2971-2977.
- 9- Khush, R. S., Morgan, L., Becker, E. and M. Wach. 1991 Use of the polymerase chain reaction (PCR) in Agaricus bisporus breeding programs. In:

- "Genetics and Breeding of Agaricus". (Ed. L.J.L.D. Van griensven). Pudoc. Ageninge. pp.73-80.

 - 10- Mehta, K. B. and M. S. Bhandal. 1994. Genetic improvement in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. In: "Advances in Mushroom Biotechnology". (Eds: M.C. Nair, C. Gokulapalan and Lads Adan). Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp.70-77.
 - 11- Miller, R. E. 1971. Evidence of sexuality in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 63: 630-634.
 - 12- Pandey, M. and R. P. Tewary. 1994. Strategies for selection and breeding of edible mushroom. In: "Advances in Mushroom Biotechnology". (Eds: M.C. Nair, C. Gokulapalan and Lads Adan). Scientific Publishers, Jodhpur, India, pp. 61-69.
 - 13- Pathak, V. N., Yada, N. and G. Maneesha. 1998. Mushroom Production and Processing Technology. Agro Botanica, India. 179pp.
 - 14- Raper, C. A., Raper, J. R. and R. E. Miller. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 63: 1088-1117.
 - 15- Sonnenberg, A. S. M., DeGroot, P. W . J., Schaap, P. J., Baars, J. J., Visser, J., and L. J. L. D. VanGriensven. 1996. Isolation of expressed sequence Tags of *Agaricus bisporus* and their assignment to chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4542-4547
 - 16- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Ilvak, K.J., Rafalski, J. A. and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
 - 17- Zolan, M. E., and P. J. Pukkila. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus einereus*. *McL. Cell. Bid.* 6:195-200.

Optimization of *Agrobacterium* - mediated transformation of potato (*Solanum tuberosum*) with *gus* gene

E. Doranie-oliaie - M. Farsi - A. R. Bagheri - B. Ghreyazie¹

Abstract

Efficiency of gene transfer to plants depends on genotype of plants and the adopted method. Three varieties of potatoes, Desire, Agria and Cosima were included in this experiment and three types of explant, internode, leave and microtubers were produced from each genotype. PBI 121 plasmid with *gus* gene under control of CaMV 35S promoter was used as vector. Positive transgenic plants were directly regenerated from leaf discs in the presence of kanamycin as a selectable agent. Transgenic plants were confirmed using PCR. Positive plants were used in *gus* assay. A high percentage (96%) of these plants showed *gus* expression of the gene in transformed plants. Even after three sub-culture they indicated a considerable stability of the inserted gene.

Keywords: Potato, *Agrobacterium*, genetic transformation, *gus*, PCR

¹- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University Mashhad and Reserch Instituteof Biotechnology, Karaj Respectively

تولید اسپاون هیبرید در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus*

به منظور افزایش عملکرد

محمد فارسی - حمیدرضا گردان^۱

تاریخ دریافت ۸۰/۲/۴

چکیده

علیرغم اهمیت اقتصادی زیاد و تولید وسیع جهانی قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* مشکلات اصلاحی این قارچ که بیشتر به زیست‌شناسی خاص آن برمی‌گردد، همواره مطرح بوده است. در این تحقیق، بهبود ژنتیکی این قارچ از طریق استفاده از خاصیت هتروزیس با استفاده از تلاقي‌های بروون نژادی برای افزایش عملکرد بررسی شد. ابتدا از نژادهای موجود و اهدایی خارج از کشور کشتهای تک‌اسپوری تهیه و پس از ۱۵ تا ۲۵ روز از این کشتها اسپاون تهیه شد. در تمام مراحل فوق، تنوع بازیدیوسپورها از نظر سرعت رشد و نوع پرگنه در محیط کشت جامد PDA و اسپاون مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌های هر نژاد از نظر عملکرد در چهار گروه خوب، متوسط، کم و صفر قرار گرفتند. سپس ارتباط این گروه‌ها با شکل پرگنه و سرعت رشد آنها در کشت اسپاون بررسی شد. ایزوله‌هایی که در گروه‌های عملکردی کم و صفر قرار گرفته بودند برای دورگ گیری و تولید اسپاون هیبرید مورد استفاده قرار گرفتند. در آزمون میوه‌دهی، برخی از هیبریدهای بدست آمده نسبت به والدین خود در محیط کشت جامد و اسپاون از رشد سریعتری برخوردار بودند. باندهای حاصل از ناشانگر RAPD که در ایزوله‌های نژاد A15 مورد بررسی قرار گرفت چند شکلی قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. همبستگی مثبت و شدیدی بین تعداد باندهای مشاهده شده و عملکرد مشاهده شد.

مقدمه:

اطلاعات نسبتاً اندکی از زیست‌شناسی این قارچ در دست بود (۴) بطوریکه کارهای اصلاحی بر روی این قارچ فقط بر اساس گزینش تصادفی انجام می‌شد. در سالهای ۱۹۷۱ و ۱۹۷۲ گزارش شد که این قارچ در طی چرخه زندگی خود وضعیت هموتالیسم ثانویه دارد (۱۱ و ۱۴)، یعنی هر بازیدیوسپور دارای دو هسته میوزی با تیپ آمیزشی متفاوت می‌باشد. در این قارچ سلولهای میسلیوم چند هسته‌ای هستند و هیچ مدرکی دال بر مهاجرت هسته‌ای یا جفت شدن آنها وجود ندارد (۱۲) و غالباً میسلیوم‌ها از بازیدیوسپورهایی با دو هسته هاپلوئیدی متفاوت از نظر تیپ آمیزشی به وجود می‌آیند. در حقیقت مانع اصلی در اصلاح این

قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید رایج ترین فارچی است که در سراسر جهان کشت می‌شود و در مجموع ۴۰ درصد کل تولید قارچهای خوراکی دنیا را به خود اختصاص داده است (۱۳). در اوخر دهه ۱۹۹۰ ارزش اقتصادی تولید جهانی این قارچ تقریباً ۷ میلیارد دلار آمریکا تخمین زده شده است. علیرغم اهمیت اقتصادی زیاد قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید، برنامه‌های اصلاحی برای بهبود عملکرد آن با مشکلات زیادی همراه بوده است. یکی از مهمترین دلایل این امر، فقدان دانش کامل درباره زیست‌شناسی این قارچ می‌باشد (۳). تا قبل از سال ۱۹۷۰

^۱- به ترتیب استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و مریم پژوهشی جهاد دانشگاهی واحد مشهد.