

جداسازی و تعیین خصوصیات جهش یافته‌های حاصل از پرتوتابی با اشعه ماوراء بنفش در قارچ تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)

علیرضا مطلبی آذر^۱، فرزاد رسولی^{۲*} و محمدعلی اعظمی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۳۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۲۶)

چکیده

در قارچ تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) به دلیل چرخه زندگی آن، که از سیستم هموتالیسم ثانویه پیروی می‌کند، تنوع ژنتیکی بسیار پایین است که مانعی برای پیشرفت به‌نژادی آن محسوب می‌گردد. یکی از روش‌های ایجاد تنوع از طریق جهش القایی می‌باشد. بر همین اساس در پژوهش حاضر از قدرت جهش‌زایی پرتو ماوراء بنفش (UV) در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید استفاده شد. برای اعمال جهش در این پژوهش از سه روش استفاده گردید. در روش اول قطعات میسلوم به مدت صفر، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، در روش دوم سوسپانسیون اسپور به مدت صفر، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه و در روش سوم قطراتی از سوسپانسیون اسپور روی محیط کشت پخش شده و به مدت زمان‌های صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه تحت تیمار پرتو UV قرار داده شدند. به‌طور تصادفی از تیمارهای جهش‌زایی تعدادی انتخاب و از آنها بذر قارچ تهیه شده و به‌منظور بررسی خصوصیات ژنوتیپ‌های انتخاب شده به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در بستر مناسب کشت شدند. ایجاد تنوع در صفات اندازه‌گیری شده در اثر پرتو UV از جمله تعداد روز تا پنجه‌دهی کامل، تولید پین و برداشت، تعداد کلاهک، وزن تک میوه، عملکرد، کارایی بیولوژیکی، مقدار پروتئین، به غیر از ماده خشک و خاکستر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که تنوع در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید با استفاده از جهش‌زایی می‌تواند افزایش یابد.

واژه‌های کلیدی: قارچ تکمه‌ای سفید، هموتالیسم ثانویه، قطعات میسلوم، سوسپانسیون اسپور

۱. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲ و ۳. استادیاران گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Farrasoli@gmail.com

مقدمه

قارچ‌های خوراکی در سطح جهانی حائز اهمیت فراوانی هستند. در بین قارچ‌های خوراکی موجود در طبیعت قارچ تکمه‌ای سفید (*White Button Mushroom*) از نظر تغذیه‌ای و درمانی با سایر قارچ‌های خوراکی تفاوت چندانی ندارد، اما آنچه این قارچ را از سایر قارچ‌ها کاملاً متمایز ساخته است، گسترش جهانی تولید و فروش آن است. در مجموع به‌طور متوسط، قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید ۴۰٪ کل تولید قارچ‌های خوراکی را در دنیا به خود اختصاص داده است. در ایران نیز این قارچ در بین تمامی قارچ‌های خوراکی ۸۵٪ سطح زیر کشت را به خود اختصاص داده است (۸). در نتیجه به‌نژادی و به‌زراعی قارچ تکمه‌ای سفید حائز اهمیت فراوانی است. به‌نژادی قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید در مقایسه با سایر قارچ‌های خوراکی از همه مشکل‌تر است که غالباً ناشی از چرخه زندگی و زیست‌شناسی خاص آن می‌باشد. تقریباً چرخه زندگی در تمامی جمعیت‌های تجاری و اکثر گونه‌های وحشی قارچ‌های خوراکی تکمه‌ای سفید از سیستم هموتالیسم ثانویه (*Secondary homothalism*) پیروی می‌کنند که در این سیستم تولیدمثلی اسپورهای متفاوت به‌ندرت با هم تلاقی پیدا می‌کنند، در نتیجه امکان تولید نوترکیبی پایین بوده و به‌دنبال آن تنوع هم در این گونه بسیار پایین می‌باشد (۷). درحالی‌که موفقیت یک برنامه به‌نژادی در هر محصولی به وسعت و درجه تنوع در ژنوتیپ‌های موجود بستگی دارد (۱۳). جهش در ایجاد تنوع و بهبود صفات زراعی می‌تواند روشی ساده، کاربردی و مفید باشد. همچنین در بین جهش‌زاهای پرتو ماوراء بنفش (*Ultraviolet radiation*) در مقایسه با سایر جهش‌زاهای همیشه در دسترس، ساده و ارزان است (۳). در قارچ‌ها نیز مثل سایر محصولات کشاورزی پژوهش‌های مختلفی در ارتباط با کاربرد عوامل جهش‌زا انجام شده است. در قارچ تکمه‌ای سفید در سال ۱۹۲۷ اولین جهش یافته طبیعی (جهش خودبه‌خودی) را شناسایی کردند که کلاهک‌های آن رنگ کرم داشتند و امروزه به‌صورت یک رقم تجاری در تمام دنیا پراکنده شده است

(گل‌تپه و همکاران، ۲۰۰۹). با توجه به اینکه قارچ خوراکی تکمه‌ای تحت شرایط کاملاً کنترل شده پرورش می‌یابد و نیازمند کنترل شدید شرایط محیطی است در نتیجه زودرس شدن محصول حتی چند روز می‌تواند هزینه پرورش را به‌صورت قابل توجهی کاهش دهد. کوانگ (۱۰) با تیمار سوسپانسیون اسپور به‌وسیله نور ماوراءبنفش در قارچ صدفی (*Pleurotus eryngii*) دو سویه جداسازی کردند که به‌صورت معنی‌داری سرعت رشد بالاتری در مقایسه با شاهد داشتند. لی‌یو و همکاران (۱۱) با پرتودهی میسلیم قارچ شی تاکه (*Lentinula edodes*) ۲۳ کلون جداسازی کردند که رشد میسلیم سریع‌تری داشتند. چی و همکاران (۴) در گانودرما (*Ganoderma lucidum*) با استفاده تیمار پرتوپلاست با نور ماوراءبنفش سویه جهش یافته‌ای تولید کردند که سرعت رشد بیشتری داشتند. همچنین در قارچ‌های دیگر نیز از جمله قارچ‌های رقیب کلاهک‌دار (*Coprinus cinereus*)، صدفی صدف درخت (*Pleurotus ostreatus*)، صدفی خرما (*Pleurotus pulmonarius*) و آگروسیبه سیلندریکا (*Agrocybe cylindrica*) با استفاده از جهش‌های القایی با مواد شیمیایی و پرتوهای جهش‌زا گزارش شده‌اند. همچنین در طبیعت و در اثر جهش‌های خودبه‌خودی نیز در برخی گونه‌ها همچون قارچ‌های شی تاکه (*Lentinula edodes*)، شیزوفیلوم (*Schizophyllum commune*) و رقیب کلاهک‌دار سویه‌های بدون اسپور یافت شده‌اند (اوباتاکه و همکاران ۲۰۰۳). از اهداف دیگر جهش در قارچ‌های خوراکی جداسازی سویه‌های بهبود یافته از نظر مورفولوژیکی و عملکرد بوده است. موکرچی و سنگوپتا (۱۹۸۶) با استفاده از اشعه‌دهی پرتوپلاست با UV در قارچ شی تاکه چهار جهش یافته مورفولوژیکی را گزارش کردند. ژانجانگرا و هارسویو (۲۰۰۸) جهت به‌نژادی قارچ صدفی فلوریدا (*Pleurotus florida*) از اشعه گاما استفاده کردند و توانستند یک سویه جهش یافته تولید کنند که دارای تعداد اندام بارده بیشتر با قطر زیاد و وزن‌تر بالاتری بودند، به‌عبارت دیگر عملکرد بالاتری داشت. ژو و همکاران (۲۰۰۸) با

مورد استفاده قرار گرفت. پرتو دهی به سه روش انجام شد. الف) پرتو دهی قطعات میسلیم: قطعاتی از کلاهک در شرایط استریل بر روی محیط کشت (Potato Dextrose Agar) کشت شد. بعد از ۱۰ تا ۱۵ روز هنگامی که رشته‌های میسلیم رشد کرده و اکثر نقاط پتری دیش را اشغال کردند از نقاط انتهایی پرگنه (Propagual) قطعات کوچک ۲-۱ میلی‌متری جدا ساخته و روی محیط کشت PDA جدید گذاشته شدند. سپس به مدت زمان‌های متفاوت (صفر، ۴، ۸، ۱۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) در معرض لامپ پرتو ماوراء بنفش قرار گرفتند (۱۵).

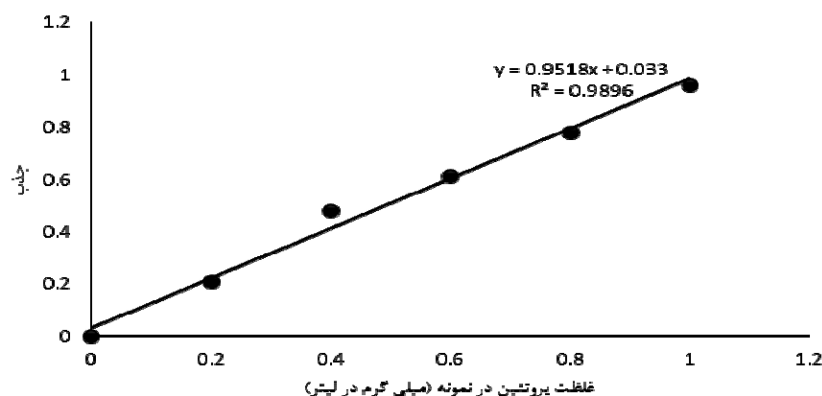
ب) پرتو دهی سوسپانسیون اسپورها: از طرح اسپورهای (Spore print) تهیه شده با استفاده از آب مقطر استریل سوسپانسیون اسپور غلیظ تهیه شده و سپس سه مرتبه (۱/۰، یک درصد و ۰/۰۰۱) رقیق شدند. سپس این سوسپانسیون در یک پتری دیش ریخته شده و به فاصله ۱۰ سانتی‌متری در معرض اشعه UV قرار گرفت. زمان‌های استفاده شده برای این روش شامل صفر، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه بودند (۱). بعد از پرتو دهی با سرنگ استریل سوسپانسیون اسپور برداشته شد و بر روی محیط کشت حاوی PDA منتقل شدند.

ج) پرتو دهی اسپورهای پخش شده روی محیط کشت: در این روش قبل از جهش، اسپورهای رقیق شده به صورت قطراتی روی محیط کشت PDA پخش کرده و سپس به فاصله ۱۰ سانتی‌متری در معرض اشعه UV قرار داده شدند. زمان‌های در نظر گرفته شده برای این روش مدت زمان‌های صفر، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ دقیقه در نظر گرفته شدند (۱). لازم به ذکر است در تمامی تیمارها بعد از جهش پتری دیش‌ها در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از اسپورهایی که زنده مانده و میسلیم تولید نمودند، بذر قارچ (Spawn) تهیه شد. همچنین از لامپ ماوراء بنفش ۱۵ وات و با شدت یک ژول بر متر در ثانیه در فاصله ده متری (۱۴) استفاده شد. در هر سه روش تعدادی را هم براساس تفاوت‌های مشاهده شده در رشد میسلیم و هم به‌طور تصادفی انتخاب و از آنها اسپاون تهیه شد.

پرتو دهی پرتوپلاست در قارچ گانودرما (*Ganoderma luidum*) با اشعه ماوراء بنفش یک جهش یافته تولید کردند که میزان رشد آن به‌صورت معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. کای و همکاران (۲۰۱۰) میسلیم‌های قارچ صدفی گونه سیتروپیلتوس (*Pleurotus Citrinopileatus*) را تحت پرتو دهی اشعه گاما قرار دادند که توانستند یک سویه جهش یافته تولید کنند که دارای سرعت رشد بالاتری به‌میزان ۲۱ درصد نسبت به شاهد بود. در مطالعه‌ای که به‌وسیله دان و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد سوسپانسیون اسپور قارچ شاه صدف را با نور UV تیمار کردند و سپس آن را رقیق کرده و بر روی محیط کشت PDA پخش کردند، که در نهایت ۱۱ جهش یافته جدا کردند که همگی به‌طور معنی‌داری دارای عملکرد بالاتری نسبت به سویه اصلی بودند که البته دو عدد از آن‌ها عملکرد حدود ۳۴٪ و ۳۵٪ بالاتر از سویه اصلی تولید کردند و به‌عنوان PL-10 و PL-5 نامگذاری شدند. لیسو و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از جهش به‌وسیله نور UV در قارچ شی‌تاکه دو سویه جدید اصلاح کردند که دارای عملکرد بالاتری بوده و زودتر به مرحله بلوغ رسیدند که عملکرد این دو تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت. لذا در پژوهش حاضر، با استفاده از اشعه ماوراء بنفش دو ماده ازدیادی قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (اسپور و میسلیم) جهش داده شدند. هدف این پژوهش استفاده از جهش‌زایی جهت ایجاد تنوع و تغییرات در تعدادی از صفات کمی و کیفی در جهش‌یافته‌های احتمالی به‌دست آمده بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به‌منظور ارزیابی خصوصیات ژنوتیپ‌های جهش‌یافته احتمالی استفاده گردید. نژاد A15 با سرعت رشد پنجه دوانی متوسط، کارایی بیولوژیکی متوسط و سفتی مناسب (۶) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین ارقام تجاری قارچ تکمه‌ای سفید کشت شده در ایران از یکی از شرکت‌های داخلی تولید کننده اسپاون خریداری و



شکل ۱. منحنی استاندارد پروتئین

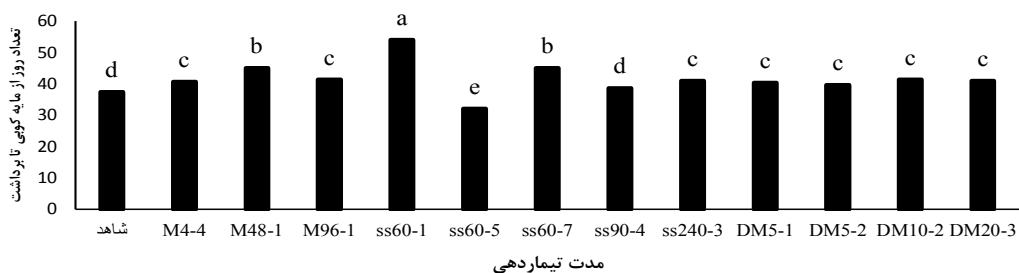
برای هر بستر اندازه‌گیری شد و بعد از ۳ چین برداشت عملکرد کل نیز محاسبه شد (۱۲). برای سنجش غلظت پروتئین محلول در بافت قارچ، از پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin) استفاده گردید. برای تهیه استانداردها غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر BSA تهیه شد که به هر کدام ۱۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد اضافه گردید. سپس از عصاره نمونه‌های قارچ تهیه شده ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و با ۱۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد و ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر و یا بافر فسفات پتاسیم با همدیگر در داخل یک میکروتیوب ریخته شده و تمامی این نمونه‌ها و نمونه‌های استاندارد به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردیده و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر مدل Spekol 1500 (کشور سازنده) قرائت گردید. منحنی استاندارد با توجه به جذب پروتئین‌های استاندارد رسم گردید (شکل ۱) و سپس غلظت پروتئین محاسبه شد (۲).

تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

برای شناسایی تنوع ایجاد شده و جداسازی سویه‌های زودرس

بعد از کشت، اولین پارامتری که ارزیابی شد تعداد روزهای لازم برای هر واحد آزمایشی تا پنجه دوانی کامل (گسترش کامل میسلیم در بستر) بود، که سرعت رشد میسلیم با این شاخص ارزیابی می‌شود. همچنین بعد از خاک‌دهی تعداد روز لازم تا اولین بین‌دهی (Pinning) و تعداد روز تا اولین برداشت از زمان خاک‌دهی نیز جهت تعیین زودرسی یادداشت‌برداری شدند. تعداد کلاهک به ازای هر بستر کشت یا به عبارتی دیگر تعداد میوه برداشت شده در هر بستر کشت شمارش شدند. میانگین اندازه قارچ براساس نسبت وزن تازه اندام‌های بارده برداشت شده به تعداد کل آنها محاسبه گردید (۱۲). درصد کارایی بیولوژیکی (BE) از نسبت وزن قارچ برداشت شده به وزن خشک بستر کشت اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری درصد ماده خشک، قارچ‌ها به ۴ تا ۸ قسمت تقسیم شده، سپس نمونه‌هایی به میزان ۱۰۰ گرم در داخل کیسه کاغذی قرار داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون گذاشته شدند. حدود یک ساعت بعد از بیرون آوردن نمونه‌ها و خنک شدن، آنها را وزن نموده و مقدار ماده خشک بر حسب درصد محاسبه شدند. برای اندازه‌گیری خاکستر اندام بارده، یک گرم از ماده خشک پودر شده اندام بارده را در داخل چینی ریخته و به مدت ۶ ساعت در داخل کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و درصد خاکستر محاسبه گردید. میزان عملکرد براساس وزن تر در هر برداشت



شکل ۲. مقایسه میانگین تعداد روز از ماه کوبی تا برداشت در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم ss: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

دقیقه جداسازی شدند که همگی دیررس‌تر از شاهد بودند و اختلاف معنی‌داری با آن در سطح احتمال یک درصد داشتند. در این روش هم همانند روش تیمار قطعات میسلیم در ارتباط با تولید واریته زودرس موفقیتی حاصل نشد.

یکی از مهم‌ترین صفات در تمامی محصولات کشاورزی عملکرد می‌باشد که تحت تأثیر عوامل محیطی شدیداً در نوسان است با تغییر ژنتیکی پایدار می‌توان به عملکرد قابل اطمینان دست یافت. در این آزمایش با توجه به جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) هر سه روش جهش‌زایی قطعات میسلیم، سوسپانسیون اسپور و قطرات اسپور نور ماوراء بنفش در ایجاد تنوع در صفت عملکرد اثر معنی‌داری داشته است. در روش تیمار قطعات میسلیم، سه سویه M4-2، M4-3 و M8-1 جدا شدند که نسبت به شاهد تقریباً ۱۰ درصد عملکرد بیشتری داشتند که این اختلاف عملکرد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. دو سویه M24-7 و M48-2 نیز با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد عملکرد پایبتری تولید کردند. در روش سوسپانسیون اسپور تنوع بیشتری نسبت به روش تیمار قطعات میسلیم ایجاد شد. سویه‌های ss90-1، ss120-2 و ss120-4 جداسازی شدند که نسبت به شاهد ۸ تا ۹ درصد عملکرد بالاتری تولید کردند که اختلاف مشاهده شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. سویه‌های ss60-1، ss60-4 و

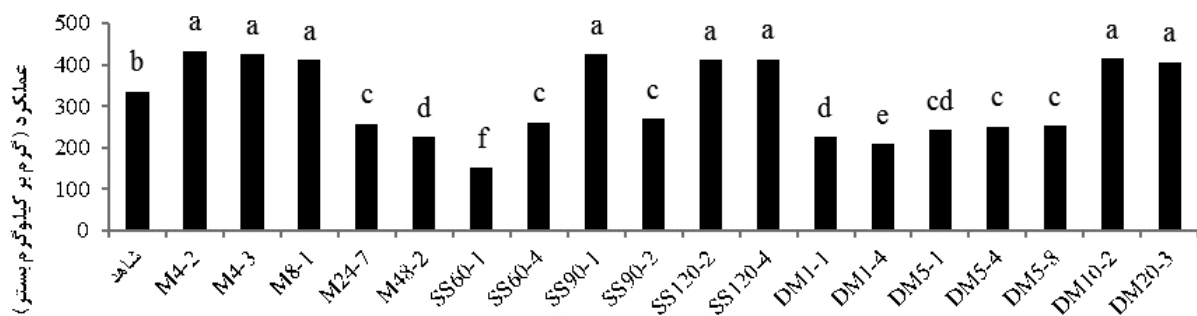
و دیررس تعداد روز از ماه کوبی اسپاون تا برداشت در تمامی نمونه‌ها در هر سه روش جهش‌زایی محاسبه گردید. در تیمار قطعات میسلیم سه سویه M4-4، M48-1 و M96-1 در تیمارهای ۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت شناسایی و جداسازی گردیدند که نسبت به شاهد دیررس‌تر بودند و اختلاف هم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در روش تیمار قطعات میسلیم در نمونه‌های بررسی شده هیچ‌گونه موفقیتی در ارتباط با تولید سویه زودرس حاصل نشد. در روش تیمار سوسپانسیون اسپور تنها سویه ss60-5 در تیمار ۶۰ دقیقه جداسازی شدند که زودرس‌تر از شاهد بودند، تقریباً ۵ روز زودتر به مرحله برداشت رسید که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار بود (شکل ۲).

همچنین سه سویه ss60-1، ss60-7 و ss240-3 نیز شناسایی شدند که با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دیررس‌تر از شاهد بودند. لازم به ذکر است سویه ss60-1 دیررس‌ترین سویه جدا شده در تمامی تیمارها بود که بیش از دو هفته نسبت به شاهد دیرتر به مرحله برداشت رسید و همچنین در تمامی مراحل قبلی رشد از جمله پنجه‌دوانی و بین‌دهی نیز بسیار دیرتر از شاهد مرحله مذکور را کامل نمود. در روش تیمار قطرات اسپور ۵ سویه DM5-1، DM1-5، DM5-2، DM10-2 و DM20-3 در تیمارهای ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰

جدول ۱. جدول تجزیه واریانس اثر جهش‌زایی قطرات اسپور با پرتو ماوراء بنفش بر برخی صفات ارزیابی شده در قارچ تکمه‌ای سفید

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییرات
پروتئین	خاکستر	ماده خشک	عملکرد	وزن تک میوه	تعداد کلاهک	تعداد روز تا اولین برداشت		
۵۱/۸۷۵**	۰/۸۰۷ ^{ns}	۰/۵۷۴ ^{ns}	۶/۸۸۹**	۲/۷۵۱**	۷/۶۴۲**	۵/۷۵۴**	۳۴	تیمار
۰/۰۲۸	۰/۹۵۹	۱/۱۰۰	۹۴۷/۱۰۰	۰/۴۴۹	۳/۹۰۵	۰/۴۲۹	۷۰	اشتباه آزمایشی
۷/۲	۱۱/۰۰	۱۱/۷	۱۰/۱	۴/۱	۱۰/۸	۳/۶		ضریب تغییرات (%)

ns عدم اختلاف معنی‌دار ** بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

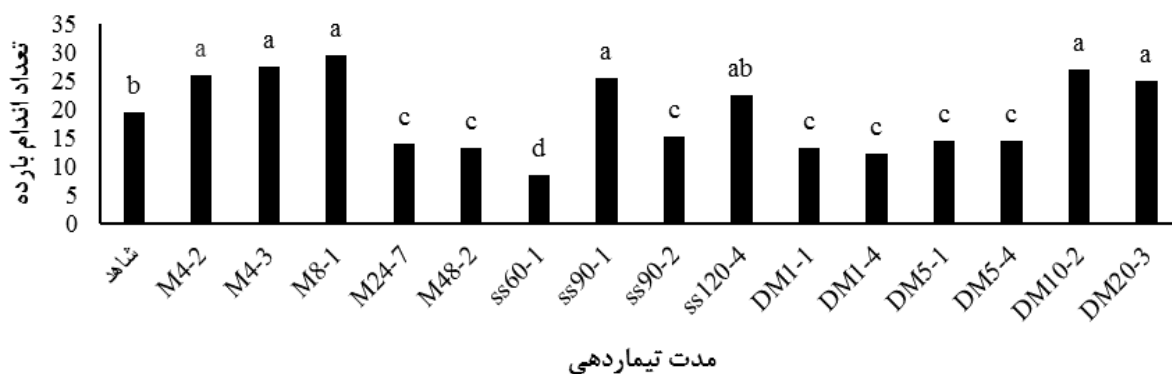


مدت تیمار دهی

شکل ۳. مقایسه میانگین عملکرد در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور، DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

تنوع و سپس بهبود صفات مورد نظر بوده است، در مورد صفت عملکرد سویه‌هایی هم با عملکرد بالاتر و هم با عملکرد پایین‌تر در مقایسه با شاهد به‌دست آمد. کمترین عملکرد با ۱۵۰ گرم در یک کیلوگرم بستر در سویه جهش‌یافته احتمالی ss60-1 و بیشترین عملکرد در سویه M8-1 با ۴۳۳ گرم در یک کیلوگرم بستر بوده است. با توجه به اینکه اجزاء عملکرد شامل تعداد کلاهک و وزن آن می‌باشد در قسمت‌های مربوط به نتایج و

با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نسبت به شاهد عملکرد پایین‌تری داشتند. در روش تیمار قطرات اسپور سویه‌های DM10-2 و DM20-3 عملکرد بالاتری در مقایسه با شاهد داشتند و سویه‌های DM1-1، DM5-1، DM5-4، DM5-8 و DM5-4 در مقایسه با شاهد با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد عملکرد کمتری تولید کردند (شکل ۳). با توجه به اینکه هدف اصلی در این پژوهش ابتدا ایجاد

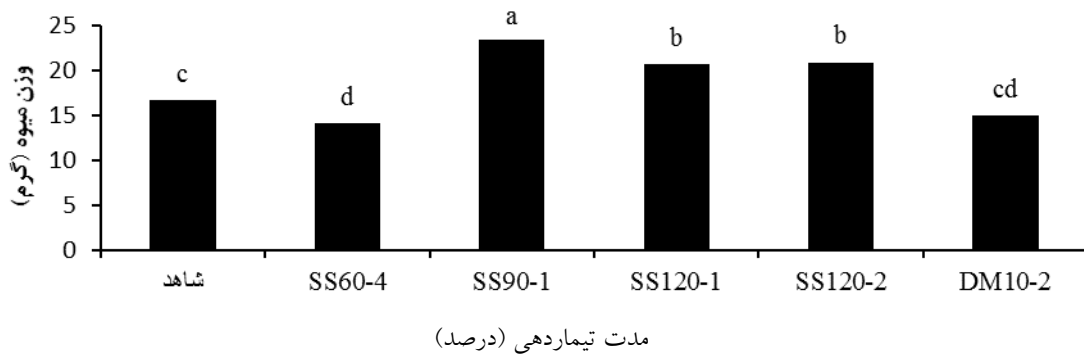


شکل ۴. مقایسه میانگین تعداد اندام بارده در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

کمتری تولید کردند. در روش تیمار سوسپانسیون اسپور در بین تمامی نمونه‌های تیمار شده دو سویه ss60-1 و ss90-2 با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد کلاهک کمتری نسبت به شاهد داشتند. سویه ss90-1 هم تعداد کلاهک بیشتری در مقایسه با شاهد تولید کردند. در این پژوهش تیمار قطرات اسپور با نور ماوراء بنفش جهت ایجاد تنوع موفقیت‌آمیز بود به طوری که هفت سویه شناسایی و جدا گردیدند. دو سویه DM10-2 و DM20-3 با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد تعداد کلاهک بیشتری در مقایسه با شاهد تولید کردند و چهار سویه DM5-1، DM1-4، DM5-1 و DM5-4 نسبت به شاهد با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد تعداد کلاهک کمتری تولید کردند (شکل ۴). یکی از اجزاء عملکرد تعداد کلاهک می‌باشد در نتیجه سویه‌هایی که تعداد میوه بیشتری داشتند احتمالاً عملکرد بیشتری هم داشته باشند. سویه‌هایی که تعداد کلاهک بیشتری در مقایسه با شاهد تولید کردند، در نهایت عملکرد بیشتری هم داشتند و در مقابل سویه‌هایی که در مقایسه با شاهد با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد تعداد کلاهک کمتر تولید کردند در نتیجه عملکرد کمتری هم داشتند. اما سویه DM1-5 با اینکه تعداد کلاهک بیشتری تولید کرد ولی در افزایش عملکرد تأثیر

بحث این صفات، بحث عملکرد هم بیشتر توضیح داده شده است. بیجان و ناویوت (۱) با استفاده از پرتو دهی گاما سویه‌هایی با عملکرد بالاتر در قارچ صدفی (*Pleurotus sp*) تولید کردند که البته با استفاده از پرتو ماوراء بنفش موفق نبودند. دجاجانگرا و هارسوویو (۵) در قارچ صدفی (*Pleurotus florida*) با استفاده از پرتو دهی گاما توانستند سه سویه با عملکرد بیشتر نسبت به شاهد تولید کنند. کوانگ (۱۰) با استفاده از نور ماوراء بنفش در قارچ صدفی (*Pleurotus eryngii*) دو سویه جهش یافته جداسازی کردند که دارای عملکرد بیشتری بودند.

همان‌طور که در جداول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داده شده است اثر تیمار نور ماوراء بنفش در تعداد کلاهک تشکیل شده در هر سه روش جهش‌زایی در سطح احتمال احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. در روش تیمار قطعات میسلیم سویه‌های M4-2 و M4-3 و M8-1 به صورت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد تعداد کلاهک بیشتری نسبت به شاهد تولید کردند که البته سه سویه مذکور با همدیگر هیچ اختلاف معنی‌داری نداشتند. دو سویه M24-7 و M48-2 نیز شناسایی و جداسازی شدند که با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نسبت به شاهد تعداد اندام بارده



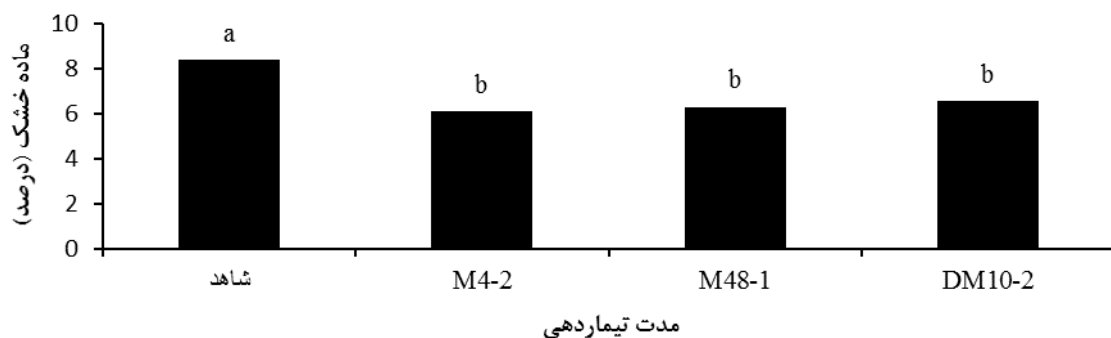
شکل ۵. مقایسه میانگین وزن تک میوه در سویه های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته اند.

ولی از لحاظ آماری اختلاف معنی دار نبود (شکل ۵). همچون تعداد میوه، وزن تک میوه هم یکی دیگر از اجزاء عملکرد می باشد. در تیمار SS60-4 با وزن تک میوه کمتر در مقایسه با شاهد منجر به کاهش معنی دار عملکرد شده است. در سویه SS90-1 با وجود اینکه وزن تک میوه بالاتری در مقایسه با شاهد داشتند ولی چون تعداد کلاهک کمتری تولید شده، افزایش وزن تک میوه در عملکرد تأثیر مثبتی نداشته است. ولی در سویه SS120-2 در مقایسه با شاهد افزایش وزن تک میوه با افزایش عملکرد همراه بوده است. در روش تیمار قطرات اسپور سویه DM10-2 با وجود کاهش معنی دار در وزن تک میوه در مقایسه با شاهد عملکرد افزایش یافته است چون تعداد کلاهک بیشتری تولید شده است و کاهش وزن تک میوه را جبران نموده است. در هر صورت افزایش تعداد میوه برای افزایش عملکرد می تواند مفیدتر باشد چون قارچ های خوراکی تکمه ای بزرگ تر از حد معمول بازارپسندی کمتری دارند.

با توجه به جدول تجزیه واریانس داده ها (جدول ۱) نور ماوراء بنفش در ایجاد جهش در روش های تیمار قطعات میسلیم و قطرات اسپور در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی داری بر درصد ماده خشک اندام بارده داشته است ولی در روش تیمار سوسپانسیون اسپور با نور ماوراء بنفش در بین سویه های ارزیابی شده هیچ گونه اختلاف معنی داری مشاهده

معنی داری نداشته است. همچنان که در بالا ذکر گردید M8-1 بیشترین عملکرد را در بین تمامی نمونه های ارزیابی شده در هر سه روش داشته است که بیشترین تعداد کلاهک یعنی ۲۹/۶۷ عدد را تولید شده است و در طرف مقابل سویه SS60-1 با کمترین تعداد میوه یعنی ۸/۶۷ عدد، کمترین عملکرد را در بین تمامی سویه های بررسی شده تولید کرده است.

با توجه به جداول تجزیه واریانس داده ها (جدول ۱) در این پژوهش دو روش جهش زایی تیمار سوسپانسیون و قطرات اسپور با نور ماوراء بنفش در ایجاد تنوع وزن تک میوه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی داری داشته است ولی در روش تیمار قطعات میسلیم بین سویه های ارزیابی شده اختلاف معنی داری با شاهد مشاهده نشد. در روش جهش زایی با سوسپانسیون اسپور ۴ سویه جدا گردیدند که از لحاظ آماری با شاهد اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد داشتند. وزن تک میوه در سه سویه SS90-1، SS120-1 و SS120-2 جهش یافته احتمالی نسبت به شاهد با اختلاف معنی داری در سطح احتمال یک درصد بیشتر بود و تنها سویه SS60-4 نیز جدا گردید که وزن تک میوه در مقایسه با شاهد کمتر بود که اختلاف مشاهده شده در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. در روش جهش زایی قطرات اسپور با نور ماوراء بنفش تنها سویه DM10-2 جداسازی شد که وزن تک میوه کمتر از شاهد بود

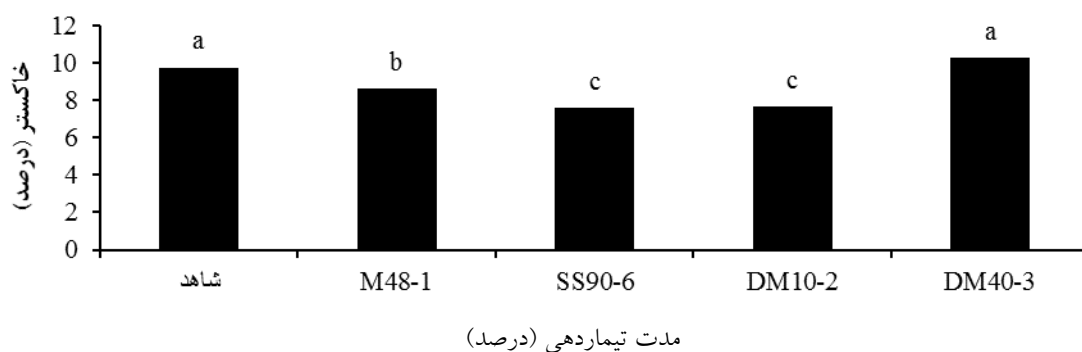


شکل ۶. مقایسه میانگین ماده خشک در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

میسلیم سویه M48-1 جداسازی گردید که با کمترین مقدار خاکستر در بین تمامی نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با شاهد داشت. در روش سوسپانسیون اسپور سویه ss90-6 جدا شده با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در مقایسه با شاهد مقدار خاکستر کمتری به دست آمد. در روش تیمار قطرات اسپور هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین سویه‌های بررسی شده حاصل از تیمار قطرات اسپور در مقدار خاکستر مشاهده نشد (شکل ۷). همیشه بین جذب مواد معدنی در اندام بارده (کلاهک) و ماده خشک با میزان خاکستر همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد (۱۷). پس همچنان که در مقدار ماده خشک اشاره شد در این پژوهش تنها روش تیمار قطعات میسلیم در افزایش مقدار ماده خشک اثر معنی‌داری داشته است در میزان خاکستر هم نیز چنین بوده است. البته با توجه به هدف نخست این پژوهش که ایجاد تنوع بوده است دو روش دیگر هم تا حدودی اگرچه کمتر ولی باعث ایجاد تنوع شده‌اند. در سویه DM10-2 که درصد خاکستر کمتری در مقایسه با شاهد داشته هم‌زمان مقدار ماده خشک کمتری هم داشته است و همچنین تعداد کلاهک بیشتر و عملکرد بیشتر و وزن تک میوه کمتری در مقایسه با شاهد داشته است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) می‌توان ادعا کرد که هر سه روش در ایجاد جهش و تنوع صفت

نشد. در روش تیمار قطعات میسلیم دو سویه M4-2 و M48-1 جدا شده که از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت و در تیمار قطرات اسپور سویه DM10-2 درصد ماده خشک پایین‌تری با اختلاف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار داشت (شکل ۶). با توجه به اینکه ماندگاری و کیفیت قارچ خوراکی منوط به ماده خشک می‌باشد لذا افزایش ماده خشک می‌تواند جزو اهداف مهم در به‌نژادی قارچ خوراکی باشد. در این پژوهش در جهت افزایش مقدار ماده خشک موفقیتی حاصل نشد اگرچه در پژوهش‌های قبلی با استفاده از جهش نتایج قابل قبولی به دست آمده است. دجاجانگرا و هارسویو (۵) با استفاده از تیمار پرتو گاما یک سویه به دست آوردند که دارای مقدار ماده خشک بالاتری در مقایسه با شاهد بوده است. گانگ و همکاران (۹) در قارچ گانودرما با استفاده از نور ماوراء بنفش یک سویه جهش یافته را شناسایی و جداسازی کردند که دارای مقدار ماده خشک بیشتری بود.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که تیمار نور ماوراء بنفش تأثیر معنی‌داری بر مقدار خاکستر داشته است، به عبارت دیگر تیمار مذکور در ایجاد تنوع در صفت مقدار خاکستر در میوه موفقیت‌آمیز بوده است. در روش تیمار قطعات

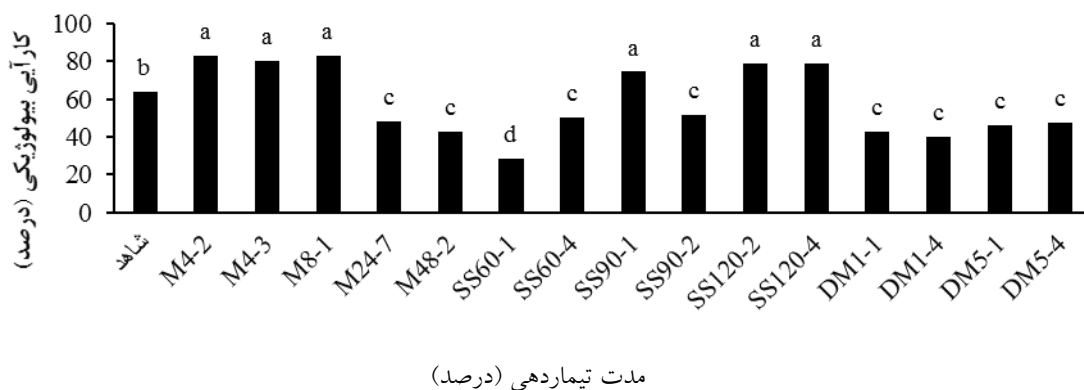


شکل ۷. مقایسه میانگین مقدار خاکستر (درصد) در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

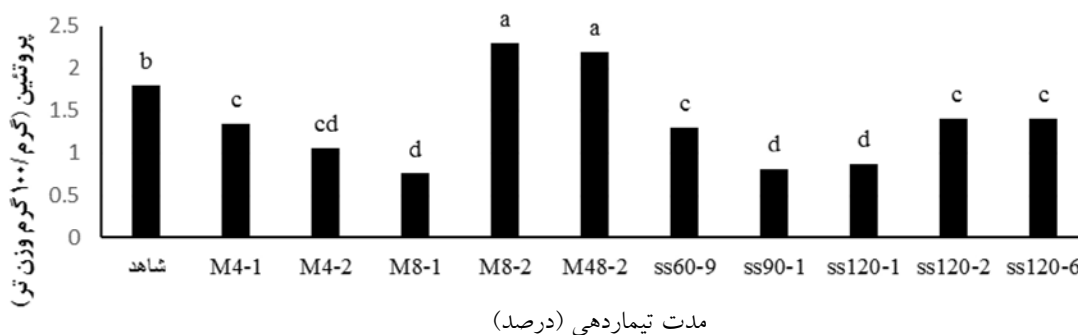
تیمار سوسپانسیون اسپور بوده که در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری با شاهد داشت ولی با دو سویه مذکور حاصل از ۱۲۰ دقیقه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. در روش تیمار قطرات اسپور با نور ماوراء بنفش سویه‌های DM1-1 و DM5-1 و DM1-4 و DM5-4 در مقایسه با شاهد و با اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد کارایی بیولوژیکی پایتتری داشتند (شکل ۸). کارایی بیولوژیکی طبق فرمول با عملکرد ارتباط مستقیم دارد، بنابراین با توجه به میزان عملکرد کارایی بیولوژیکی هم متفاوت خواهد بود. کارایی بیولوژیکی در سویه‌های جهش یافته احتمالی M4-2، M8-1، ss90-1، ss120-2 و ss120-4 کارایی بیولوژیکی بالاتری و هم‌زمان عملکرد بالاتری داشتند. در مقابل سویه‌های M24-7، M48-2، ss60-1، ss60-4 و ss90-2 عملکرد کمتر آنها با کارایی بیولوژیکی پایین همراه بوده است. در سویه‌های حاصل از تیمار قطرات اسپور نیز همانند دو روش مذکور افزایش عملکرد با افزایش کارایی بیولوژیکی همراه بوده است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داده است که تیمار نور ماوراء بنفش در هر سه روش استفاده شده در ایجاد تنوع در مقدار پروتئین اثر معنی‌داری داشته است. نتایج بررسی

کارایی بیولوژیکی کاملاً مؤثر عمل کرده‌اند، به عبارتی دیگر تأثیر تیمارهای نور ماوراء بنفش بر روی قطعات میسلیم، سوسپانسیون اسپور و قطرات اسپور از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. در روش تیمار قطعات میسلیم ۵ سویه شناسایی و جداسازی گردیدند که با شاهد در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. دو سویه پایین‌تری داشتند و همچنین سه سویه M4-2، M4-3 و M8-1 نسبت به شاهد درصد بالاتری از کارایی بیولوژیکی مشاهده گردید. در روش تیمار سوسپانسیون اسپور سویه ss60-1 شناسایی و جدا گردید که در مقایسه با شاهد و سایر نمونه‌های بررسی شده کمترین مقدار کارایی بیولوژیکی را دارا بود. همچنین دو سویه ss60-4 و ss90-2 نیز درصد کارایی بیولوژیکی آنها با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد کمتر از شاهد بود. دو سویه ss120-2 و ss120-4 نیز در تیمار ۱۲۰ دقیقه جدا شد که درصد کارایی بیولوژیکی بالاتری نسبت به شاهد داشتند که اختلاف مشاهده شده از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود. سویه ss90-1 که دارای بیشترین کارایی بیولوژیکی در بین نمونه‌های بررسی شده در



شکل ۸. مقایسه میانگین کارایی بیولوژیکی در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.



شکل ۹. مقایسه میانگین غلظت پروتئین در سویه‌های پرتوتابی شده با پرتو ماوراء بنفش. M: سویه‌های جداسازی شده از تیمار قطعات میسلیم SS: سویه‌های حاصل از تیمار سوسپانسیون اسپور DM: سویه‌های حاصل از تیمار قطرات میسلیم. ستون‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری معنی‌دار نیستند (دانکن ۱٪). مدت تیماردهی: مدت زمانی که نمونه‌ها تحت پرتو ماوراء بنفش قرار گرفته‌اند.

شناسایی و جدا گردیدند که همگی آنها در مقایسه با شاهد مقدار کمتری پروتئین داشتند. این سویه‌ها در تیمارهای ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه جداسازی شدند که همه این اختلاف‌ها در سطح احتمال یک درصد نسبت به شاهد معنی‌دار بودند. در روش تیمار قطرات اسپور سویه‌ای با مقدار پروتئین متفاوت از شاهد شناسایی و مشاهده نشد (شکل ۹). تاکنون گزارشی در ارتباط با تأثیر جهش‌زایی در مقدار پروتئین در پژوهش‌های قبلی منتشر نشده است، با این وجود در این پژوهش با توجه به تنوع ایجاد

نمونه‌های جدا شده از روش تیمار قطعات میسلیم با استفاده از نور ماوراء بنفش نشان داده که ۵ عدد آنها در مقایسه با شاهد در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. از این تعداد ۳ سویه M4-1، M4-2 و M8-1 نسبت به شاهد با اختلاف معنی‌داری مقدار کمتری پروتئین داشتند. دو سویه M8-2 و M48-2 نیز در مقایسه با شاهد مقادیر پروتئین بیشتری تولید کردند که اختلافات مشاهده شده در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در روش سوسپانسیون اسپور ۵ سویه

شده می‌توان ادعا کرد که مقدار پروتئین با استفاده از جهش قابل تغییر و بهبود است. در سویه M8-1 که یکی از سویه‌های بود که بیشترین عملکرد را داشت ولی مقدار پروتئین آن نسبت به شاهد با اختلاف معنی‌داری کمتر بود که در نتیجه از نظر کیفی، با وجود عملکرد بالاتر، در سطح پایین‌تری در مقایسه با شاهد قرار داشت.

منابع مورد استفاده

1. Beejan, P. H. F. and R. Nowbuth. 2009. Use of irradiation for the induction of mutations in *Oyster Mushrooms* for improvement of Strains. In: Proceedings of an International Joint FAO/IAEA Symposium, Vienna, Austria, PP. 289-292.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.
3. Chang, S. T. and P. G. Miles. 2004. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect and Environmental Impact. CRC Press. New York.
4. CHI, X., Z. Wang, R. Zhang. 2006. Breeding of *Ganoderma lucidum* polysaccharide-peptide complex (GPSpc) high yield strain by UV Induced protoplast mutagenesis and substituted effect of GPSpc on antibiotics in broiler chicken. *Journal of Agricultural Biotechnology* 14(4): 51.
5. Djajanegara, I. and Harosyo. 2008. White oyster mushroom (*Pleurotus Florida*) mutant with altered antioxidant contents. *Biotropia- The Southeast Asian Journal of Tropical Biology* 15(1): 65-73.
6. Eleni, M., P. Antonios, L. Gregory and D. Panagiota. 2007. Valuation of productivity and postharvest quality during storage of five *Agaricus bisporus* strains. *Journal of Food Quality* 30: 646–663.
7. Elliott, T. J. 1978. Comparative sexuality in *Agaricus* species. *Microbiology* 107: 113-122.
8. Farsi, M. and H. Gordan. 2007. Edible Mushroom Cultivation and Breeding with Emphasis on: The White Mutton Mushroom. Jahad Daneshgahi Mashhad Press. Mashhad. (In Farsi).
9. Gang, L., Y. Fan, L. Ruixue, X. Zhixiang and L. Baojian. 2001. A study on the breeding of new *Ganoderma* varieties by UV induced mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica* 2: 017.
10. Kuang D. 2010. Breeding by UV mutation of high yield *Pleurotus eryngii* strains (Abstract). *Journal of Anhui Agricultural Science* 16: 046.
11. Liu, G., J. Jia, L. Li, L. Liu, Z. Liu, L. Tai and Q. Huang. 1997. Study on the breeding of *lentimula edodes* through mutation of protoplast induced by UV radiation (Abstract). *Acta Edulis Fungi*.
12. Mamiro, D. P., D. J. Royes and B. R. Beelman. 2007. Yield, size, and mushroom solids content of *Agaricus bisporus* produced on non-composted substrate and spent mushroom compost. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1289-1296.
13. Massiha, S., M. Moghadam and R. Motallebazar. 2001. Vegetable Breeding. Tabriz University Press. Tabriz. (In Farsi).
14. Obatake, Y., S. Murakami, T. Matsumoto and Y. Fukumasai-Nakai. 2003. Isolation and characterization of a spore less mutant in *Pleurotus eryngii*. *Mycoscience* 44: 33-40.
15. Ravishankar, S., M. Pandey, R. P. Tewari and V. Krishna. 2006. Development of spore less/ low sporing strains of *Pleurotus* through mutation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1021-1025.
16. Sonnenberg, A. S. M., J. J. P. Baars, P. M. Hendrickx, B. Lavrijssen, W. Gao, A. Weijn and J. J. Mes. 2011. Breeding and strain protection in the button mushroom *Agaricus bisporus*. In: Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7). pp: 7-15.
17. Zarjini, T., N. M. Anvari and M. Mohammadian. 1390. Scientific Principles of Mushroom Production. Zarrjin Press. Iran. (In Farsi).

Isolation and Characterization of UV-Induced Mutants of White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*)

A. Motallebiazar¹, F. Rasouli^{2*} and M. A. Aazami³

(Received: June 20-2016; Accepted: October 17-2016)

Abstract

The white button mushroom (*Agaricus bisporus*) is one of most widely cultivated edible mushroom species in the world. Despite the long term history of production and its economic importance, the breeding efforts in the species have been limited. The main reason is the typical life cycle that restricts cross-ability between single spores of different strains. Thus, variability in *Agaricus bisporus* populations is very low and a majority of available strains in the markets are quite homogenous. One of the routine ways to induce the variability is using mutagens like UV irradiation. In the present study we used three methods for mutagenesis induction. In the first method, the fragments of mycelium were treated with UV irradiation for eight exposure times (0, 4, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours). In the second method, spore suspension was exposed to UV irradiation for 6 exposure times (0, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes). In the third method, 1 ml of sterile spore suspension was immediately exposed to 6 UV radiation exposure times (0, 1, 5, 10, 20 and 40 minutes). The UV lamp (10-W) was placed about 10 cm above the samples. Spawn running, pin production rate and harvest time, fruit body number, fruit body size, fruit body yield, biological efficiency (BE), dry weight, ash percent and protein content were evaluated. Results showed that all the methods were promising. This study revealed that mutagenesis induction by UV can be a useful and quick way to induce diversity in *A. bisporus*. Also the UV application could be a cost effective efficient method in the breeding program of this edible mushroom species.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Biological efficiency, Irradiation, Mutagenesis, Mycelium, Spawn

1. Associate Professor, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

2, 3. Assistant Professors, Department of Horticulture Science, Faculty of Agriculture, Maragheh University, Maragheh, Iran.

*. Corresponding Author, Email: Farrasoli@gmail.com