نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 28، شماره 3، پاییز 1393، ص. 337-327
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 327-337
ISSN: 2008 - 4730

بهبود عملکرد قارچ دکمه‌ای سفید با استفاده از روش گزینش تک‌اسپوری به کمک نشانگر AFLP

محسن علی‌پور[1]- محمد فارسی[2*]- امین میرشمسی کاخکی[3]

تاریخ دریافت: 1391/05/02
تاریخ پذیرش: 1392/12/06

چکیده

قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus*، یکی از قارچ‌های رشته‌ای با اهمیت اقتصادی بالا است. پایداری جدایه‌های این قارچ برای تولیدکنندگان اسپاون و قارچ اهمیت بالایی دارد. در واحدهای تولیدی نژادهای مادری عمدتاً به‌صورت واکشت‌های مکرر بر روی محیط‌کشت غنی تکثیر می‌شوند، که رشد غیر متعارف و عملکرد ضعیف از پیامدهای این امر می‌باشد. دلایل این موضوع تاکنون ناشناخته مانده است. استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از راه‌های ارزیابی و شناخت تغییرات ژنتیکی است. در این مطالعه برای اولین بار از نشانگر تکرارپذیر AFLP برای ارزیابی تغییرات ژنتیکی و کمک به گزینش جدایه‌های تک‌اسپور برتر نژادی تجاری (Holland737) قارچ دکمه‌ای استفاده گردید. 30 جدایه تک‌اسپوری مورد مطالعه از لحاظ سرعت رشد و عملکرد متنوع بودند، وراثت الگوی باندی نشانگر AFLP نیز وجود این تنوع را تأیید نمود. 9 جفت ترکیب آغازگری، 353 باند تولید کرد که از این میان 53 باند در میان 19 جدایه تک‌اسپور به‌صورت چند شکل بودند. نتایج این تحقیق، کارآیی روش گزینش تک‌اسپوری در به‌نژادی این قارچ را مورد تأیید قرار داد. دو جدایه به‌طور متوسط 47 درصد نسبت به نژاد مادری افزایش عملکرد داشتند. هم‌چنین مشخص گردید که نشانگر AFLP، حساسیت کافی برای شناسایی چندشکلی ژنتیکی جدایه‌های تک‌اسپوری را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بهبود عملکرد، تنوع ژنتیکی، قارچ دکمه‌ای سفید گزینش تک‌اسپوری، AFLP، *Agaricus bisporus*

مقدمه

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus*، ارزش تجاری زیادی در سراسر دنیا دارد، به‌گونه‌ای‌که در سال 2009 ارزش نقدی حاصل از فروش این قارچ فقط در آمریکایی شمالی، نزدیک به 909 میلیون دلار بوده است، هم‌چنین کشور ما نیز با تولید 40 هزار تن در سال، جایگاه هجدهم جهانی تولید این محصول با ارزش را به خود اختصاص داده است (1 و 29).

متوسط عملکرد این قارچ در کشور 22-18 کیلوگرم به ازای 100 کیلوگرم کمپوست است، که حدود 70 درصد متوسط عملکرد این قارچ در دنیا می‌باشد، مشکلات مربوط به کمپوست، عدم تأمین شرایط بهینه رشد، استفاده از نژادهای کم محصول و پس‌روی نژادی[4] از دلایل این امر به‌شمار می‌روند. عملکرد قارچ دکمه‌ای، به کیفیت میسلیوم مادری که خود طی فرآیندهای به نژادی طولانی و پرهزینه به دست می‌آید، وابسته است. با وجود این بیش‌تر این میسلیوم‌ها به علت تکثیر رویشی پیاپی توسط تولیدکنندگان اسپاون و قارچ، دچار پس‌روی نژادی شده که از علائم آن، ظهور ناهنجاری‌های رشدی میسلیوم (پنبه‌ای شدن) و کاهش شدید عملکرد است. بنابراین استفاده مداوم از روش‌های به‌نژادی به‌منظور حفظ و بهبود نژادهای مادری امری ضروری می‌باشد (2 و 3).

قارچ دکمه‌ای سفید با توجه به چرخه زندگی ویژه خود که به‌صورت هموتالیک ثانویه است، طی تکثیر جنسی در 90 درصد موارد به‌صورت ترجیحی بازیدیوسپورهایی با دو هسته غیر خواهری تولید می‌کند، که پس از جوانه‌زنی به میسلیوم هتروکاریون خودبارور تبدیل می‌شود و در 10 درصد موارد بازیدیوسپورهایی با دو هسته خواهری تولید می‌کند که پس از جوانه‌زنی به میسلیوم خود عقیم تبدیل می‌شوند (2، 18 و 28).

روش‌های اصلاحی قارچ دکمه‌ای می‌تواند به دو صورت گزینش هتروکاریون‌ها و تولید نژاد F1 حاصل از آمیزش هموکاریون‌ها باشد. در اثر آمیزش هموکاریون‌ها، یک میسلیوم هتروکاریون خود بارور

1، 2و3- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: (Email: mohfarsi@yahoo.com

4- Degeneration

به‌وجود می‌آید، میسلیوم‌های حاصل از آمیزش پس از آزمون عملکرد مقدماتی، مورد آزمایشات عملکرد تکمیلی قرار می‌گیرند. این روش به‌نژادی اگر چه مزایای زیادی مانند استفاده از هتروزیس و قابلیت ترکیب صفات مفید نژادهای مختلف را دارد، ولی جداسازی میسلیوم‌های هموکاریون از هتروکاریون و تشخیص هموکاریون‌های تلاقی یافته دو مشکل عمده در استفاده از این روش اصلاحی می‌باشد (2، 8 و 12). روش گزینش هتروکاریون‌های برتر بر اساس تنوعی است که میسلیوم‌های حاصل از بازیدیوسپورهای هتروکاریون خودبارور از خود نشان می‌دهند. در این روش نیز پس از گزینش‌های اولیه و اطمینان از هتروکاریون بودن میسلیوم‌ها، آزمایشات عملکرد مقدماتی و تکمیلی انجام می‌شود. به‌طورکلی آزمایشات متعدد نشان داده‌اند که میسلیوم‌های حاصل از جوانه‌زنی تک‌اسپورها، از نظر سرعت رشد، ظاهر میسلیوم، مورفولوژی کلاهک، میزان باروری و عملکرد متفاوت می‌باشند (6، 10، 19، 25). هم‌چنین در مطالعات متعددی به کمک روش گزینش هتروکاریون‌ها، جدایه‌های با عملکرد بالاتر از نژاد مادری خود بدست آمده است (9، 10، 20).

در قارچ دکمه‌ای سفید، علاوه بر بررسی‌های فنوتیپی، نشانگرهای مولکولی متعددی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی بازیدیوسپور به کار رفته است. نشانگر RFLP[1] وجود تنوع اندک (کم‌تر از 5 درصد) در میان بازیدیوسپورهای قارچ دکمه‌ای سفید را نشان داده است، با این وجود استفاده از این نشانگر وقت‌گیر، خسته‌کننده و پرهزینه می‌باشد. هم‌چنین از نشانگر RAPD[2] به منظور ارزیابی تنوع نتاج تک‌اسپور این قارچ استفاده شده است، این نشانگر نیز دارای تکرار پذیری پایینی است (1، 5 و 7). هم‌چنین از نشانگرهای SSR[3] و ISSR[4] برای شناسایی نژادهای تجاری و نمایش تنوع درون قارچ دکمه‌ای استفاده شده است (14و 15).

نشانگرهای AFLP[5] در سال 1995 معرفی شد و به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ترادف نوکلئوتیدی DNA، دقت و تکرار پذیری بالا، ابزاری موثر در مطالعات ژنوم به شمار می‌رود (30). این نشانگر به‌طور موفقیت آمیزی در تعیین تنوع نتاج تک‌اسپور قارچ *A. blazei* به‌کار رفته است. به‌طوری‌که تمام باندهای نژاد مادری، حداقل در یکی از نتاج تک‌اسپور وجود داشت و علاوه بر این برخی از نتاج تک‌اسپور باندهای منحصر به فرد داشتند. هم‌چنین این نشانگر به‌طور موفقیت آمیزی در تهیه شناسنامه ژنتیکی 12 نژاد تجاری قارچ دکمه‌ای سفید به کار رفته است (4، 7 و 23). لذا در این تحقیق به‌همراه بررسی‌های فنوتیپی، از نشانگر AFLP به‌منظور بررسی و گزینش بازیدیوسپورهای هتروکاریون برتر قارچ دکمه‌ای سفید نژاد Holland737 استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه نژاد: میسلیوم و کلاهک مادری قارچ دکمه‌ای سفید، نژاد Holland737 به‌ترتیب از آزمایشگاه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد و شرکت پرورش قارچ سایه رس تهیه گردید.

تهیه بازیدیوسپور: یک عدد قارچ متوسط که پرده زیر کلاهک آن به شدت کشیده شده بود، انتخاب، پایه و پرده زیر کلاهک قطع شد، کلاهک روی کاغذ صافی سترون، در یک ظرف پتری سترون قرار گرفته و یک بشر سترون بر روی آن‌ها قرار گرفت. پس از گذشت 72 ساعت بازیدیوسپورها بر روی کاغذ صافی جمع شدند (1).

کشت و تندش بازیدیوسپورها: یک مایع تعلیقی غلیظ از اسپورها تهیه و پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم 1 درصد، با آب مقطر سترون، شستشو انجام شد و با استفاده از یک لام گلبول شمار، غلظت اسپورها بر روی 80000 اسپور بر میلی‌لیتر تنظیم و 200 میکرولیتر از آن، به ظرف پتری محتوی محیط کشت PDA[6] منتقل شد. برای به حداقل رساندن آلودگی باکتریایی از استرپتومایسین با غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. ظروف به اتاقک رشد منتقل و در درجه حرارت 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (5).

جداسازی میسلیوم‌های هتروکاریون: برای جداسازی هتروکاریون‌ها، پرگنه‌های منفرد با تندش سریع‌تر، علامت‌گذاری و به محیط‌کشت جامد و غنی CE/CYM[7] منتقل گردید و به‌منظور رشد در 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه اسپاون: اسپاون تمام جدایه‌های تک‌اسپور به همراه میسلیوم مادری به روش فارسی و گردان تهیه گردید (1). به‌طور خلاصه 5 کیلوگرم گندم در 7 لیتر آب به مدت 30 دقیقه جوشانیده شد. بعد از سرد شدن دانه‌های گندم، 30 گرم سولفات کلسیم هیدراته و 60 گرم کربنات کلسیم به آن‌ها اضافه گردید. از این مخلوط 200 گرم به کیسه‌های پلاستیکی مخصوص اسپاون منتقل و به مدت 2 ساعت در دمای 121 درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. به‌منظور تلقیح، در زیر هود استریل قطعه‌ای از میسلیوم هر جدایه به قطر تقریبی 1 سانتی‌متر به دانه‌های گندم منتقل شد. کیسه‌های گندم به اتاقک رشد منتقل و در دمای 24 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون میوه‌دهی: فرآیند کمپوست‌سازی و پاستوریزاسیون طبق روش مرسوم در ایران انجام شد. سه کیلوگرم کمپوست با 50 گرم از

1- Restriction Fragment Length Polymorphism
2- Random Amplification of Polymorphic DN
3- Simple Sequence Repeat
4- Inter Simple Sequence Repeat
5- Amplified Fragment Length Polymorphism

6- Potato Dextrose Agar
7- Compost Extract/Complete Yeast Medium agar

اسپاون هر جدایه مایه‌زنی و برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد. گسترش شبکه میسلیومی در دمای 24 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی90-85 درصد انجام شد. خاک‌دهی، هوادهی و ایجاد شرایط برای تبدیل مرحله زایشی به رویشی مطابق روش مرسوم در ایران انجام گرفت (2)، برداشت کلاهک به مدت یک ماه از زمان اولین برداشت انجام و در تمامی جدایه‌ها میزان تولید اندام میوه‌دهی یاداشت‌برداری شد.

جدا سازی DNA: میسلیوم تمامی بازیدیوسپورهای جداسازی شده در محیط‌کشت مایع CE/CYM به مدت 28 روز کشت شد و از روش مبتنی بر CTAB برای جداسازی DNAی ژنومی استفاده شد (27). مقدار و کیفیت DNAی ژنومی توسط الکتروفورز و اسپکتروفتومتر بررسی شد.

آزمایش AFLP: مراحل مختلف آزمون AFLP بر اساس روش وس و همکاران (30) و با اندکی تغییرات صورت گرفت. به‌طور خلاصه DNAی ژنومی با استفاده از دو آنزیم *Eco*RI و *Taq*I، هضم آنزیمی شد. به‌منظور هضم کامل ژنوم، محلول واکنش به‌مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و دو ساعت در دمای 65 درجه سانتی‌گراد که بهترین دما برای عمل آنزیم‌های *Eco*RI و *Taq*I می‌باشند قرار گرفت. سپس رابطهای دو رشته‌ای طی چهار ساعت در دمای 12 درجه سانتی‌گراد به انتهای قطعات برش یافته متصل شدند. تکثیر قطعات طی دو مرحله انجام گرفت. تکثیر پیش انتخابی بدون استفاده نوکلئوتید انتخابی در انتهای ´3 آغازگر و با دمای اتصال 54 درجه سانتی‌گراد در طول 30 چرخه انجام شد. تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهای انتخابی انجام گرفت. در تکثیر انتخابی در طی 14 چرخه ابتدایی هر بار به میزان 0/7 درجه از دمای اتصال ابتدایی 63 درجه سانتی‌گراد کاسته شد (Touch down) و 22 چرخه انتهایی بدون کاهش دما، با درجه اتصال 54 درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. عمل بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و به مدت 60 ثانیه در هر چرخه انجام شد. برای مشاهده الگوی باندی از ژل پلی‌اکریلامید واسرشت 6 درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی و برای رنگ‌آمیزی از روش نیترات نقره استفاده گردید (26). در مجموع با استفاده از 8 آغازگر از *Eco*RI و 8 آغازگر از *Taq*I، 32 ترکیب آغازگری بررسی گردید که با توجه به تعداد باند، میزان چند شکلی و نیز وضوح باندها، 9 ترکیب انتخاب شد (جدول1). در نهایت الگوهای باندی بر اساس نتایج تکثیر انتخابی با جفت آغازگرهای گزینش شده، تجزیه و تحلیل نهایی شدند.

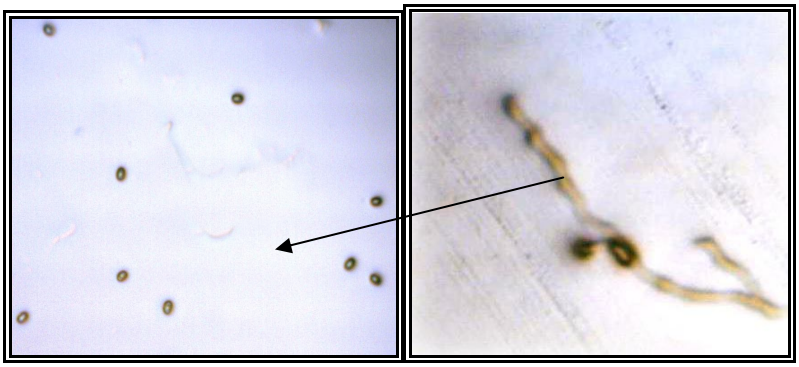
نتایج و بحث

تندش بازیدیوسپورها: یک هفته پس از کشت اسپورها در محیط کشت PDA، تندش بازیدیوسپورها آغاز شد و با مشاهدات میکروسکوپی (بزرگ‌نمایی 10 برابر عدسی شیئی)، تندش بازیدیوسپورها قابل مشاهده بود (شکل 1). بررسی و جدا کردن تک‌اسپورها تا دو هفته پس از کشت اسپور ادامه یافت. در نهایت تعداد 30 جدایه تک‌اسپور از نژاد Holland737 به دست آمد.

به نظر می‌رسد، سه مورد شستشوی اسپورها با هیپوکلریت سدیم رقیق (1 درصد)، استفاده از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با غلظت 25 میکروگرم بر میلی‌لیتر و انتخاب تراکم مناسب (80 هزار اسپور در میلی لیتر) در تهیه کشت‌های تک‌اسپور خالص و عاری از آلودگی، بسیار موثر واقع شد، به طوری که آلودگی باکتریایی به صفر رسید (6). در فرایند کشت اسپورهای قارچ دکمه‌ای سفید، معمولاً اسپورهای هموکاریون دیرتر جوانه می‌زنند. در این آزمایش برای افزایش احتمال گزینش هتروکاریون‌ها فقط 30 بازیدیوسپور که سریعتر جوانه زدند، برای انتقال به محیط کشت CE/CYM انتخاب شدند و 15 روز پس از انتقال تک‌اسپورها (پرگنه‌های منفرد)، شبکه میسلیومی هر تک‌اسپور به قدر کافی سطح محیط‌کشت را فرا گرفت (5، 6، 8).

جدول 1- ترکیب‌های مختلف آغازگری و توصیف باندهای تولید شده در 19 جدایه‌های تک اسپوری

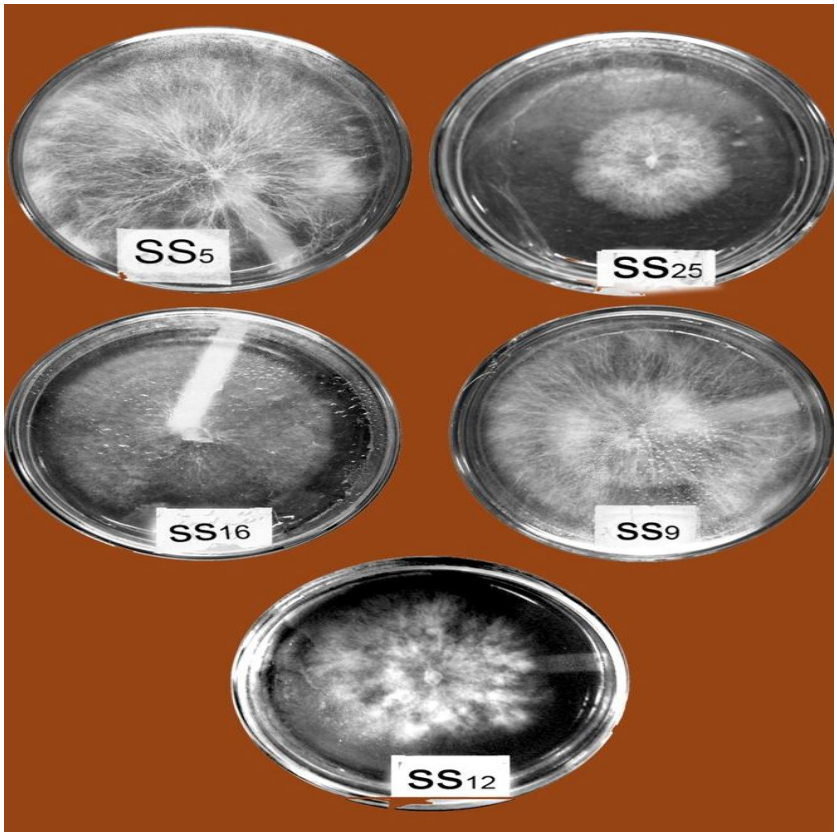
درصد باندهای چند شکل	باند چند شکل	تعداد کل باند	باز انتخابی TaqI	باز انتخابیEcoRI
23/53	8	34	GT	AC
13/33	2	15	TC	ACT
21/05	8	38	GT	AG
6/89	2	29	TA	AGA
16/16	8	48	CA	AGC
33/13	6	45	AC	CT
27/65	13	47	CA	GA
8/92	5	56	AG	TA
3/23	1	31	TT	TA
جمع	53	343		
میانگین	5/88	38/11		



شکل 1- راست: کشت اسپور نژاد Holland 737 بر روی محیط‌کشت PDA (بزرگ‌نمایی 4 برابر) ؛ چپ: اسپور تندش کرده پس از یک هفته (بزرگ‌نمایی 10 برابر). هر دو تصویر به کمک دوربین دیجیتال با بزرگ‌نمایی 150 برابر تهیه شده است.

تنوع در میان جدایه‌های خالص: در بین جدایه‌های تک‌اسپوری گزینش شده، پس از گذشت دو هفته انواع کلاس‌های سرعت رشدی (کند، متوسط، سریع و بسیار سریع) و در ارتباط با شکل پرگنه انواع تیپ رشدی (رشته‌ای 60 درصد، رشته‌ای کرکی 20 درصد، رشته‌ای بافت‌دار 20 درصد) مشاهده گردید (شکل 2). به‌طور مشابهی در آزمایشات دیگر محققان، شکل میکروسکوپی میسلیوم و برخی از شاخص‌های مورفولوژیکی در بین جدایه‌های خالص متفاوت بود (6، 8، 16 و 22).

تنوع سرعت رشدی در اسپاون: 25-15 روز پس از تلقیح 30 جدایه خالص با دانه‌های گندم، دو نوع سرعت رشدی (سریع و بسیار سریع) در محیط اسپاون مشاهده شد (شکل 3). جدایه‌هایی که در محیط جامد، دارای پرگنه رشته‌ای بوده و از سرعت رشدی بسیار سریعی برخوردار بودند، در محیط اسپاون نیز به صورت رشته‌ای و سریع رشد کردند. دیگر محققان نیز در این مورد به نتایج مشابهی دست یافتند (5).



شکل 2- تنوع شکل رشدی و سرعت رشدی میسلیوم درکشت‌های تک اسپوری 14 روزه. SS9 و SS5: رشته‌ای، SS16 و SS25: رشته‌ای کرکی و SS12: رشته‌ای بافت‌دار

شکل 3- تنوع در سرعت پر کردن اسپان پس از 20 روز: نمونه سمت راست : جدایه تک اسپور از گروه رشدی بسیار سریع (SS120) و نمونه سمت چپ : جدایه‌ای از گروه‌رشدی سریع (SS14)

تنوع در اشغال بستر کشت: گسترش شبکه میسلیومی جدایه‌ها در بستر کشت پس از 14 روز، از وضعیت متوسط (اشغال 65 درصد کمپوست) تا بسیار سریع (اشغال بیش از 91 درصد کمپوست) متغیر بود. گسترش بسیار سریع غالباً مربوط به جدایه‌هایی بود که در محیط‌کشت جامد و بذر نیز رشد سریع و بسیار سریعی داشتند و گسترش متوسط غالباً مربوط به جدایه‌های بود که در محیط کشت جامد سرعت رشد کندی داشتند. این موضوع حاکی از برتری جدایه‌های با سرعت رشد بالاتر، در استفاده از مواد غذایی و تولید بیشتر ماده خشک می‌باشد (13).

آزمون میوه‌دهی و رابطه آن با تیپ‌های رشدی: طول مدت آزمون میوه‌دهی 30 روز پس از اولین برداشت بود. همه 30 جدایه مورد مطالعه تولید میوه (کلاهک) کردند، این امر حاکی از هتروکاریون بودن همه جدایه‌ها بود (شکل 4). در روش گزینش تک‌اسپور، معمولاً هدف نهایی انتخاب جدایه‌هایی است که عملکرد بالاتری دارند. جدایه‌ها از نظر عملکرد در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌داری داشته و در چهار گروه ضعیف (عملکرد کم‌تر از 10 کیلوگرم بر متر مربع)، متوسط (عملکرد 10/1 تا 15 کیلوگرم بر متر مربع)، بالا (عملکرد 15/1 تا 20 کیلوگرم بر متر مربع) و بسیار بالا (عملکرد بیش‌تر از 20 کیلوگرم بر متر مربع)، قابل طبقه‌بندی بودند. تنوع در عملکرد بازیدیوسپورهای هتروکاریون حاصل از یک کلاهک قارچ دکمه‌ای سفید توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است. گردان و فارسی (6) دریافتند که نتاج تک‌اسپور حاصل از یک کلاهک قارچ دکمه‌ای سفید نژاد A15، علاوه بر سرعت رشدی و شکل پرگنه، از لحاظ عملکرد نیز متفاوت بودند. کلیگمن نیز به این موضوع اشاره داشته است (25).

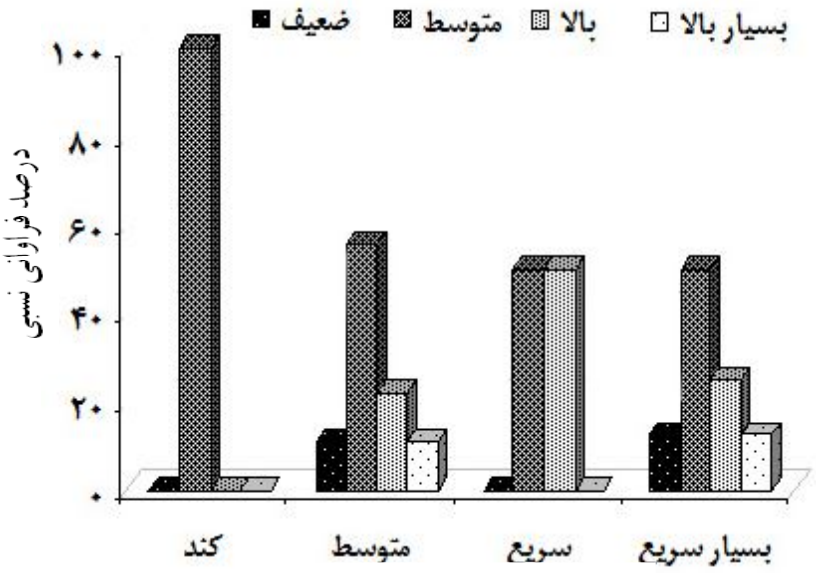
هم‌چنین در این آزمایش 11 جدایه تک‌اسپور (SS109، SS24، SS106، SS16، SS118، SS111، SS5، SS108، SS105، SS25، SS13 و SS116) عملکرد بهتری نسبت به نژاد مادری خود (با میانگین 15 کیلوگرم بر متر مربع) داشتند (جدول 2). دیگر محققان نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (9، 20، 25).

شکل 4- بررسی تشکیل اندام‌های میوه‌دهی و آزمون عملکرد جدایه‌های تک اسپوری. راست: فاز زایشی جدایه‌های تک‌اسپور (SS111 و SS108)؛ چپ: به ترتیب 1 تا 4 نشان‌دهنده روز اول، سوم، پنجم و هفتم پس از ورود به مرحله زایشی

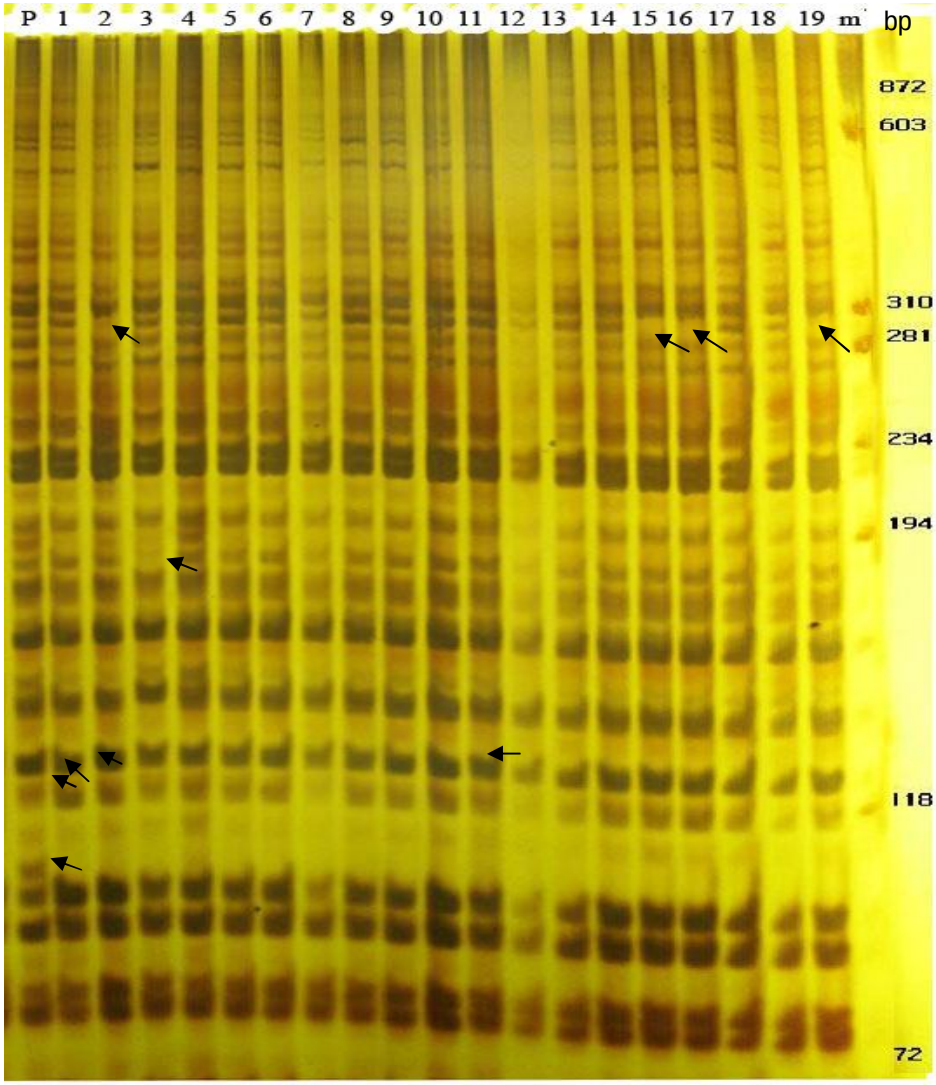
شکل 5- ارتباط شکل پرگنه جدایه‌های خالص در محیط کشت جامد با عملکرد

ارتباط شکل پرگنه جدایه‌های خالص در محیط‌کشت جامد با عملکرد: در میان جدایه‌های خالص با شکل پرگنه رشته‌ای، 5/8 درصد دارای عملکرد بسیار بالا، 41 درصد دارای عملکرد بالا، 47 درصد دارای عملکرد متوسط و 5/8 درصد دارای عملکرد ضعیف بودند. در این میان جدایه‌های با شکل پرگنه رشته‌ای کرکی، عمدتاً دارای عملکرد متوسط (66/6 درصد) بودند و هیچ جدایه‌ای از این شکل رشدی در گروه عملکردی بسیار بالا قرار نگرفتند (شکل 5). بنابراین حذف جدایه‌های خالص دارای شکل پرگنه رشته‌ای کرکی، راندمان گزینش جدایه‌های خالص با عملکرد بالاتر را افزایش می‌دهد. این موضوع با نتایج دیگر محققان مطابقت دارد (6).

ارتباط سرعت رشدی جدایه‌های خالص در محیط‌کشت جامد با عملکرد: در میان جدایه‌های خالص با سرعت رشدی بسیار سریع، 12/5 درصد دارای عملکرد بسیار بالا، 25 درصد دارای عملکرد بالا، 50 درصد دارای عملکرد متوسط و 12/5 درصد دارای عملکرد ضعیف بودند، هم‌چنین از مجموع جدایه‌های خالص با سرعت رشدی سریع 50 درصد دارای عملکرد بالا و 50 درصد دارای عملکرد متوسط بودند. به‌طور غیر منتظره‌ای 11/1 درصد جدایه‌های خالص با سرعت رشدی متوسط دارای عملکرد بسیار بالا و جدایه‌های خالص با سرعت رشدی کند، فاقد عملکرد بالا و بسیار بالا بودند. این موضوع نشان داد که حذف جدایه‌های خالص با سرعت رشدی کند (کم‌تر از 1 میلی‌متر در روز)، راندمان گزینش برای عملکرد بالاتر را افزایش می‌دهد (شکل 6).



شکل 6- ارتباط سرعت رشد جدایه‌های خالص در محیط‌کشت جامد با عملکرد



شکل 7- ژل پلی اکریلامید واسرشت 6% با استفاده از دو ترکیب جفت آغازگری *Eco-RI-CT /TaqI-AC* نژاد مادری (P)، سایز مارکر (m) و 19-1 به ترتیب نماینده جدایه‌های تک اسپور (SS7، SS8، SS10، SS13، SS17، SS24، SS25، SS26، SS102، SS103، SS104، SS105، SS109، SS111، SS113، SS116، SS117، SS118، SS120). پیکان‌های سیاه برخی از حذف باندهای منحصر بفرد را نشان می‌دهد

بررسی تغییرات الگوی باندی در میان جدایه‌های تک‌اسپوری: در این آزمایش 19 جدایه از میان 30 جدایه تک‌اسپوری به‌صورت تصادفی برای آزمون AFLP انتخاب گردید و نشانگر AFLP با 9 جفت ترکیب آغازگری، 343 باند تولید کرد (شکل 7). میانگین تعداد باندهای تکثیر شده و چند شکل به ازای هر جفت ترکیب آغازگری به‌ترتیب 38/11 و 5/88 بود (15/4 درصد چندشکلی). هم‌چنین توانایی جفت آغازگرهای مختلف در آشکارسازی چندشکلی بین جدایه‌های تک‌اسپور قارچ دکمه‌ای سفید متغیر بود. در این میان، ترکیب جفت آغازگری *Eco*RI-GA /*Taq*I-CA دارای بیش‌ترین تعداد باند چند شکل (13 باند چند شکل) و ترکیب جفت آغازگری *EcoRI*-TA /*TaqI*-TT دارای کم‌ترین باند چند شکل (1 باند چند شکل) بود (جدول 1). با توجه به میزان بالای درصد GC در ژنوم قارچ دکمه‌ای، این نتایج دور از انتظار نمی‌باشد (4). نشانگرAFLP در این آزمایش 15/4 درصد تنوع در میان جدایه‌های تک‌اسپور نشان داد که از 12 درصد چندشکلی به‌دست آمده توسط نشانگر RAPD و 5 درصد چند شکلی به‌دست آمده توسط نشانگر RFLP بیش‌تر می‌باشد، این امر خود دلیلی بر برتری نشانگر AFLP در ارزیابی تعداد مکان آللی بیش‌تر است (11 و 28). **ارتباط الگوی باندی و عملکرد:** در 19 جدایه تک‌اسپوری که مورد آزمون AFLP قرار گرفتند، تعداد باندهای حذف شده و تولید شده نسبت به نژاد مادری (Holland737) و ارتباط آن با گروه عملکردی مربوطه مورد بررسی قرار گرفت (شکل 8). به‌طورکلی کم‌ترین تغییر الگوی باندی

مربوط به جدایه تک‌اسپور SS7 (با تغییر در 6 باند) و بیش‌ترین تغییر الگوی باندی مربوط به جدایه تک‌اسپور SS120 (تغییر در 18 باند) بود.

جدول 2- شناسنامه مورفولوژیکی- مولکولی جدایه‌های تک اسپور Holland737

شماره	محیط جامد		اسپاون	کمپوست	آزمون عملکرد		آزمون AFLP ††††	
	نام جدایه	سرعت رشد†	تیپ رشدی	سرعت رشد††	سرعت رشد†††	عملکرد†††† (کیلوگرم بر متر مربع)	تعداد باند حذفی	تعداد باند جدید
-	مادری	بسیار سریع	رشته‌ای	بسیار سریع	سریع	14/9	متوسط	-	-
1	SS10	بسیار سریع	رشته‌ای	سریع	سریع	8/46	ضعیف	11	1
2	SS120	سریع	رشته‌ای	بسیار سریع	بسیار سریع	11/20	متوسط	18	-
3	SS117	سریع	رشته‌ای کرکی	سریع	متوسط	11/37	متوسط	11	1
4	SS26	بسیار سریع	رشته‌ای کرکی	سریع	سریع	11/45	متوسط	10	1
5	SS7	بسیار سریع	رشته‌ای بافت دار	سریع	متوسط	11/73	متوسط	6	-
6	SS113	متوسط	رشته‌ای	بسیار سریع	سریع	12/62	متوسط	14	1
7	SS17	کند	رشته‌ای	سریع	سریع	12/73	متوسط	10	1
8	SS104	متوسط	رشته‌ای	سریع	سریع	13/15	متوسط	13	1
9	SS103	متوسط	رشته‌ای	سریع	متوسط	13/17	متوسط	7	1
10	SS102	متوسط	رشته‌ای کرکی	بسیار سریع	متوسط	14/3	متوسط	9	-
11	SS8	سریع	رشته‌ای	سریع	سریع	14/92	متوسط	14	1
12	SS109	سریع	رشته‌ای	بسیار سریع	سریع	15/35	بالا	15	2
13	SS24	بسیار سریع	رشته‌ای	بسیار سریع	سریع	15/52	بالا	8	-
14	SS118	متوسط	رشته‌ای کرکی	سریع	متوسط	16/28	بالا	15	1
15	SS111	سریع	رشته‌ای بافت	سریع	متوسط	16/45	بالا	10	-
16	SS105	متوسط	رشته‌ای	بسیار سریع	سریع	18/30	بالا	10	-
17	SS25	سریع	رشته‌ای	سریع	متوسط	19/08	بالا	7	-
18	SS13	متوسط	رشته‌ای بافت دار	بسیار سریع	سریع	21/80	بسیار بالا	10	-
19	SS116	بسیار سریع	رشته‌ای	سریع	متوسط	22/25	بسیار بالا	11	-
20	SS112	بسیار سریع	رشته‌ای بافت	سریع	سریع	12/27	متوسط	*	*
21	SS23	سریع	رشته‌ای کرکی	سریع	سریع	12/73	متوسط	*	*
22	SS9	متوسط	رشته‌ای	سریع	متوسط	12/75	متوسط	*	*
23	SS14	سریع	رشته‌ای بافت دار	سریع	بسیار سریع	13/77	متوسط	*	*
24	SS22	بسیار سریع	رشته‌ای بافت دار	بسیار سریع	بسیار سریع	14/25	متوسط	*	*
25	SS 15	سریع	رشته‌ای	سریع	بسیار سریع	14/98	متوسط	*	*
26	SS106	سریع	رشته‌ای	بسیار سریع	متوسط	15/57	بالا	*	*
27	SS16	بسیار سریع	رشته‌ای	سریع	سریع	16/08	بالا	*	*
28	SS5	سریع	رشته‌ای بافت دار	سریع	بسیار سریع	16/88	بالا	*	*
29	SS108	سریع	رشته‌ای	سریع	متوسط	17/75	بالا	*	*
30	SS119	متوسط	رشته‌ای کرکی	سریع	متوسط	5/65	ضعیف	*	*

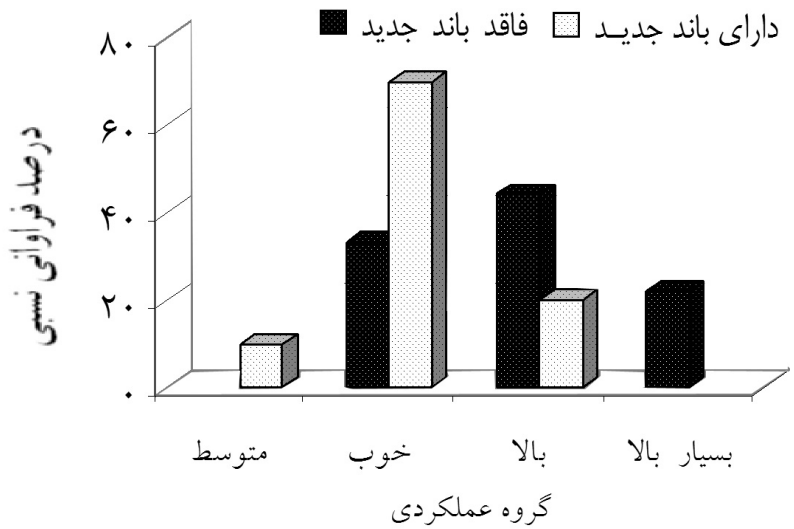
†:محاسبات براساس سرعت رشد شعاعی جدایه‌ها در 14 روز در دمای24 درجه سانتی‌گراد می‌باشد. سرعت در گروه‌های بسیار سریع، سریع، متوسط و کند به ترتیب: بیش از 2 میلی‌متر در روز، بین 1/7 تا 2 میلی‌متر در روز، بین 1 تا 1/69 میلی‌متر در روز و کمتر از 1 میلی‌متر در روز می‌باشد.

††: سریع یعنی جدایه‌هایی که 200 گرم بذر گندم را در طی 21 تا 25 روز پر کردند. بسیار سریع: یعنی جدایه‌هایی که 200 گرم بذرگندم را طی زمان 15 تا 20 پر کردند.

†††: محاسبات مربوط به 14 روز پس از مایه‌زنی است. بسیار سریع یعنی جدایه‌هایی که بیش از 91% کمپوست را پر کردند، سریع یعنی جدایه‌هایی که بین 80% تا 90% کمپوست را پرکردند، متوسط: یعنی جدایه‌هایی که 65% تا 79% کمپوست را پر کردند و ضعیف: یعنی جدایه‌هایی که کم‌تر از 65% کمپوست را پر کردند.

††††: محاسبات بر اساس 30 روز برداشت در دو تکرار می‌باشد. عملکرد ضعیف کم‌تر از 10 کیلوگرم بر متر مربع، متوسط 10/1 تا 15 کیلوگرم بر متر مربع، بالا 15/1 تا 20/1 کیلوگرم بر متر مربع و بسیار بالا بیش‌تر از 20 کیلوگرم بر متر مربع می‌باشد.

†††††: براساس نتایج به دست آمده توسط 9 جفت ترکیب آغازگری می‌باشد. علامت خط تیره نشانه شباهت با نژاد مادری و علامت ستاره (*) یعنی مورد آزمونAFLP قرار نگرفته‌اند.



شکل 8- ارتباط الگوی باندی (شامل تولید یا عدم تولید باند جدید) با عملکرد

اگرچه هر دو جدایه در گروه عملکردی متوسط قرار گرفتند، ولی جدایه تک‌اسپور SS7 در محیط‌کشت جامد، از سرعت رشد بالاتری برخوردار بود (جدول 2). هم‌چنین اکثر جدایه‌هایی که فقط زیر مجموعه‌ای از باندهای نژاد مادری را داشتند، در گروه‌های عملکردی بسیار بالا، بالا و متوسط قرار گرفتند، اما جدایه‌هایی که باندهای جدیدی نسبت به مجموعه باندهای نژاد مادری تولید کردند در گروه عملکردی متوسط و ضعیف قرار گرفتند (شکل 8). این تغییر الگوی باندی جدایه‌های تک‌اسپوری، نشانه وجود تغییراتی در توالی DNA در طی فرایند میوز و تولید اسپور می‌باشد. فارسی و گردان با استفاده از نشانگر RAPD حذف تعدادی از باندها در جدایه‌های تک‌اسپور قارچ دکمه‌ای سفید را گزارش کردند (1). هم‌چنین نشانگر RFLP حضور یک باند جدید (با اندازه‌ای متفاوت از باندهای والدی) در یکی از جدایه‌های تک‌اسپور این قارچ را نشان داد (27). تغییرات الگوی باندی در نتاج تک‌اسپور دیگر گونه‌های قارچ خوراکی نیز مشاهده شده است. نشانگر AFLP در میان 30 جدایه تک‌اسپور *A.blazei* 54 درصد چندشکلی نشان دادند (23). از جمع‌بندی فنوتیپ و ژنوتیپ میسلیوم در طی این مراحل، شناسنامه مورفولوژیکی - مولکولی جدایه‌های هتروکاریون تهیه گردید (جدول 2). این شناسنامه در برنامه‌های اصلاحی قارچ دکمه‌ای اهمیت زیادی دارد (6).

فارسی و گردان (6) دریافتند که جدایه‌های تک‌اسپور با عملکرد بالاتر از تعداد باند بیش‌تری برخوردار هستند (1)، ولی در این مطالعه رابطه مستقیمی بین عملکرد و تعداد باند مشاهده نگردید، به‌طوری که جدایه‌های با عملکرد بالا و بسیار بالا برخی تعداد باند کم‌تر و برخی تعداد باند بیش‌تری از سایر جدایه داشتند.

در این مطالعه از روش گزینش تک اسپوری به‌منظور بازیابی و بهبود عملکرد قارچ دکمه‌ای سفید، نژاد Holland737 استفاده گردید. مطابق شناسنامه مورفولوژیکی-مولکولی در بین جدایه‌های تک‌اسپور از لحاظ شکل پرگنه، سرعت رشد، میزان عملکرد و وراثت الگوی باندی نشانگر AFLP تفاوت‌های فاحشی مشاهده گردید (جدول 2). 15/4 درصد تنوع الگوی باندی نشانگر AFLP که در این آزمایش به‌دست آمد، مهر تأییدی بر سهم بالای تغییرات ژنتیکی در تنوع فنوتیپی مشاهده شده در میان جدایه‌های خالص است. در واقع گزینش تک‌اسپوری، بر اساس همین تنوعی که اسپورها از خود نشان می‌دهند صورت می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد چهار عامل کراسینگ‌آور میوزی، باز ترکیبی ژنی، باز آرایی[1] کروموزوم‌ها و جهش منطقی‌ترین دلیل برای توجیه تنوع بازیدیوسپور باشند. این مکانیسم‌ها به ویژه می‌تواند صفات چند ژنی (کمی) از جمله سرعت رشد میسلیوم و عملکرد را تحت تأثیر قرار دهد (2، 6 و 21). از نگاهی دیگر حذف و یا تولید باندها به‌دلیل همین مکانیسم‌های ایجاد تنوع ژنتیکی صورت گرفته است. با توجه به این‌که بازیدیوسپورها در نتیجه فرآیند میوز به‌وجود آمده‌اند، می‌توان اصلی‌ترین دلیل تغییرات الگوی باندی را کراسینگ‌آور میوزی دانست. البته میزان کراسینگ‌آور میوزی در *A.bisporus* var.bisporus اندک می‌باشد. کریگن و همکاران میزان کراسینگ‌آور در این قارچ را 5 درصد گزارش کردند. درصد چند شکلی پایین مشاهده شده در این آزمایش نیز با این موضوع مطابقت دارد (14، 18 و 28).

در این آزمایش به‌دلیل وجود همین تغییرات ژنتیکی که در طی تقسیم میوز و تولید بازیدیوسپورها صورت گرفته است، دو جدایه

1- Re-assortment

تک‌اسپور (SS116 و SS13)، به‌ترتیب با 48 درصد و 45 درصد افزایش عملکرد نسبت به نژاد مادری (Holland737)، در گروه عملکردی بسیار بالا قرار گرفتند (جدول 2). وجود این نوع افزایش عملکرد ناشی از تغییرات ژنتیکی بازیدیوسپورها توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است. در یک آزمایش 11 جدایه تک‌اسپور مورد گزینش قرار گرفتند که عملکرد بالاتری (12/3 درصد تا 21/98 درصد) نسبت به نژادی مادری (S11) داشتند. بنابراین نتایج این آزمایش حاکی از بروز تغییراتی در توالی ژنومی در طی تقسیم میوز و تولید تک‌اسپور می‌باشد. این تغییرات خود می‌تواند سبب بروز اثرات مثبت و مفید مانند افزایش سرعت رشد در اسپاون و کمپوست و یا حتی اثرات منفی مانند کاهش عملکرد شود (جدول 2). بنابراین به دنبال کشت تک‌اسپور وجود یک مرحله گزینش و تهیه شناسنامه موروفولوژیکی به‌منظور انتخاب موثر جدایه‌های برتر ضروری می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی نیز می‌تواند در این امر تا حد زیادی راه‌گشا باشد. همان‌طور که در این آزمایش مشخص گردید، برخی از جدایه‌هایی که فقط زیر مجموعه‌ای از باندهای نژاد مادری را داشتند، دارای عملکرد بهتری بودند. با این وجود استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه به تنهایی کفایت نمی‌کند (9).

در مجموع در این مطالعه نشان داده شد که روش کشت تک‌اسپور به همراه گزینش‌های هدفمند پس از آن، می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب در جهت حفظ و به‌نژادی قارچ دکمه‌ای سفید به ویژه نژاد تجاری Holland737 باشد.

منابع

1- فارسی م.، گردان ح. ر. 1381. تولید اسپاون هیبرید در قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید، *Agaricus bisporus* به منظور افزایش عملکرد. مجله علوم وصنایع کشاورزی. جلد 16، شماره 1 ص. 133-125.

2- فارسی م.، پوریان فر ح. ر. 1390. پرورش و اصلاح قارچ‌های خوراکی با تأکید بر: قارچ دکمه‌ای سفید. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. 275 ص.

3- فارسی م.، جلال‌زاده ب.، و ملک‌زاده خ. 1388. اصلاح و تولید نژاد دو رگ در قارچ خوراکی دکمه‌ای. ششمین کنگره علوم باغبانی ایران،22 تا 25 تیرماه 1388، دانشگاه گیلان. ص 13-11.

4- قربانی‌فعال پ.، فارسی م.، پوریان فر ح. ر.، محمودنیا میمند م.، و ذولعلی ج. 1388. تهیه شناسنامه مولکولی برای 12 نژاد اصلاح شده قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* با استفاده از نشانگرهای AFLP. مجله حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) جلد 23، شماره 1، ص 58- 67.

5- کاوسی ح. ر.، فارسی م.، شهریاری ف. ا.، فلاحتی‌رستگار م. 1384. استفاده از نشانگرهای مولکولیRAPD به منظور جدا سازی جدایه‌های هموکاریون قارچ تکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus*. مجله علوم وصنایع کشاورزی جلد 16، شماره 3، ص 46-35.

6- گردان ح. ر.، فارسی م. 1383. اصلاح عملکرد قارچ دکمه‌ای سفید با استفاده از گزینش جدایه‌های خالص و کشت‌های چند اسپوری. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. سال یازدهم، شماره دوم، شماره 1، ص. 65-77.

7- گردان ح. ر.، ذوالعلی ج.، محمودنیا م.، خاتمی م.، و فارسی م. 1387. بررسی قابلیت نشانگر AFLP در تعیین انگشت نگاری ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی قارچ خوراکی دکمه‌ای. مجله علوم و صنایع کشاورزی. جلد 22، شماره 1، ص. 27-36.

8- خاتمی راد م.، فارسی م.، و پوریان‌فر ح.ر. 1387.بررسی ترکیب‌پذیری عمومی و خصوصی ده جدایه هموکاریون در قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus*. مجله علوم کشاورزی، جلد 18، شماره 2، ص 193-181.

9- Bhandal M.S. 1986. Hybridization and genetic manipulation in *Agaricus bisporus*. In Compendium of lectures, Summer Institute on recent Development In Cultivation Technology of Edible Mushrooms. (ed) Shama S R,Dhar BL and K.B.Mehta .National Center for Mushroom Reasearch and Training, Chambaghat, Solan 55-65pp.

10- Bhandal M., and Mehta K.B.1989. Evaluation and improvement of strains in *Agaricus bisporus*. Mushroom Science, 12: 25-35.

11- Calvo-Bado L.A., Challen M.P., Thurston C.F., and Elliott T.J. 2001. RAPD characterisation of heterogeneity in spore progenies and sexuality in the genus Agaricus Mycol. Res. 105 (3): 370-376.

12- Castle A.J., Horgen P.A., and Anderson J. 1988. Crosses among homokaryons from commercial and wild-collected strains of the mushroom Agaricus brunnescens (= A. bisporus). Applied and Environmental Microbiology, 54: 1643-1648.

13- Chang S.T., and Miles P.G. 2004. Mushrooms, Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, Environmental Impact, 373-381. Boca Raton, FL: CRC PressLLC.

14- Foulogne-Orial M., Spataro C., and Savoie J.M. 2009. Novel microsatellite markers suitable for genetic studies in the white button mushroom *Agaricus bisporus*. Appl Microbiol Biotechnol, 84: 1125–1135.

15- Guan X.J., Xu L., Shao Y.C., Wang Z.R., Chen F.S., and Luo X.C. 2008. Differentiation of commercial strains of *Agaricus* species in China with inter-simple sequence repeat marker. World JMicrobiol Biotechnol 24: 1617–1622.
16- Heath M.C., Li A., Horgan P.A., and Tam P.L. 1995. Hyphal morphology associated wite strain instability in the commercial mushroom, *Agaricus bisporus*. Mycologia, 87 (4): 42-450
17- Kazuhisa T., and Teruyuki M. 2004. Strain typing of shiitake(*Lentinus edodes*) cultivars by AFLP analysis, focusing on a heat dried fruiting body. Mycoscience, 45: 79–82.
18- Kerrigan R.W., Royer J.C., Baller L.M., Kohli Y., Horgen P.A., and Anderson J.B. 1993. Meiotic behavior and linkage relationships in the secondarily homothallic fungus *Agaricus bisporus*. Genetics, 133: 225–236.
19- Kligman A. 1943. some cultural and genetic problems in cultivation of the mushroom Agaricus campestris. American Journal of Botany, 30: 745-763.
20- kneebone L.R., Patton T.J., Schultz P.G. 1974. Improvement of brown variety of *Agaricus bisporus* by single spore selection. *Mushroom. Sci*. 9: 237-243.
21- Khush RS, Becker E, Wach M. 1992. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom Agaricus bisporus. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2971–2977.
22- Li A., Begin M., Kokurewicz K., Bowden C., and Horgen P.A. 1994. Inheritance of strain instability (sectoring) in the commercial button mushroom, Agaricus bisporus. Appl. Environ. Microbiol, 60: 2384-2388.
23- Mahmud MA, Kitaura H, Masaki F, Yamada A. 2007. AFLP analysis for examining genetic differences in cultivated strains and their single-spore isolates and for confirming successful crosses in (Agaricus blazei). Mycoscience, 48: 297-304.
24- Ma F.Y., Luo X.C. 2002. PCR-based restriction analysis of internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in the genus *Pleurotus*. Mycosystema,1: 356–62.
25- Pandey M., Tewari R.P. 1994. Strategies for selection and breeding of edible mushrooms. In: Nair M.C., Gokulapala C., ADNA.1L.Eds.Advances in mushroom Biotechnology. Scientific Publishers , Jodhpur, India, pp. 61-70.
26- Sanguinetti C.J., Dias Neto E., and Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products seprated on polyacrylamide gels. Biotechniqes, 17:915-919.
27- Song S, Xu W, Zeng W, Wang Z. 2000. RAPD analysis of species diversity and genomic differences in *Agaricus bisporus*. In: "Science and cultivation of edible fungi". (Eds. Van Grienven). A. A. Balkema, Roterdam, The Netherland. pp. 191-200.
28- Summerbell R.C., Castle A.I., Horgen P.A., and Anderson J.B. 1989. Inheritance of fragment length polymorphisms in *Agaricus brunnescens*. Genetics. 123: 293-300
29- United State Department of Agriculture. 2008-2009. Mushrooms. National Agricultural Statistics Database. Washington, D. C.: USDA National Agricultural Statisitcs Service. Available at: www.nass.usda.gov. Accessed 08/31/2009)
30- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-4414.