

تأثیر کلشیسین روی قطر هسته، عملکرد و برخی صفات مورفولوژیک قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*)

سیده زهرا حسینی¹، قاسم کریمزاده^{2*} و ابراهیم محمدی گل تپه³

تاریخ دریافت: 87/1/20 تاریخ پذیرش: 88/2/29

1- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

2- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

3- استاد گروه بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

* مسئول مکاتبه Email: Karimzadeh_g@modares.ac.ir

چکیده

قارچ صدفی (*Pleurotus ostreatus*) خوراکی، صنعتی و دارویی است. در این مطالعه از کلشیسین برای ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی در قارچ خوراکی صدفی استفاده شد. به منظور تولید میسلیم ابتدا اسپور قارچ در محیط کشت MEA کشت داده شد. به منظور اعمال تیمار کلشیسین، میسلیم‌های حاصل در محیط کشت مایع زاپکس حاوی گلوکز و پپتون کشت شد. سپس محلول کلشیسین با نسبت‌های 0/3، 0/1، 0/05 و 0% (شاهد) به آن اضافه شد. به منظور مطالعه میکروسکوپی قطر هسته میسلیم‌های تیمار شده با کلشیسین، میسلیم‌ها با محلول سافرانین-او رنگ‌آمیزی شدند و قطر آنها با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس ای-ایکس 170 و دوربین دیجیتالی د-پ 50 مورد بررسی قرار گرفت. قطر هسته میسلیم‌های تیمار شده با کلشیسین در مقایسه با شاهد تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. این افزایش قطر هسته نشان‌دهنده افزایش DNA هسته‌ای و ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی است. از میسلیم‌های حاصل اسپان تهیه شد و برای ارزیابی برخی صفات مهم از اسپان‌های حاصل برای مایه‌کوبی کاه گندم استفاده شد. بعد از شروع مرحله میوه-دهی عملکرد، رنگ، طعم و طول پایه و قطر کلاهک اندازه‌گیری شد. افزایش عملکرد به میزان 82% نسبت به شاهد و افزایش قطر کلاهک و طول پایه مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: پلی‌پلوئیدی، کلشی‌سین، قارچ صدفی، قطر هسته

Effect of Colchicine on Nuclei Diameter, Yield and Some Morphological Characteristics of Oyster Mushroom (*Pleurotuse ostreatus*)

SZ Hosseini¹, G Karimzadeh^{2*} and E Mohammadi-Goltapeh³

¹MSc Student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Associate Professor, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: Email: Karimzadeh_g@modares.ac.ir

Abstract

Oyster Mushroom (*Pleurotuse ostreatus*) is one of the industrial, pharmaceutical and commercial edible basidiomycetes. In this study, we examined colchicine treatment for the production of autopolyploid *P. ostreatus*. For production of mycelium, the spores were cultured on MEA culture medium. For colchicine treatment, the mycelia were then cultured in Czapek liquid culture medium containing glucose (0.1% w v⁻¹) and peptone (0.5% w v⁻¹) adding 0, 0.05, 0.1 and 0.3% of colchicine solutions to the medium. The mycelia were stained with Safranin-O and their nuclei diameters were measured, using IX170 Olympus invert light microscope interfaced with a DP50 digital camera. The nuclei were increased in diameter at different degrees in different concentration of colchicine solutions. Such increment response indicates the increase of nuclei DNA content, verifying the autopolyploid formation of *P. ostreatus*. From the produced mycelia spawn were made and in order to evaluate some important morphological characteristics, they were used for inoculating wheat straw. After the start of fruiting stage, yield, diameter of basidiocarp and length of stem were measured. The yield was increased up to %82 compared to the control, the stem and the diameter of basidiocarp also enlarged in the colchicines-treated *P. ostreatus*.

Keywords: Colchicine, Nuclei diameter, Oyster Mushroom, Polyploidy

شده است (صارمی و همکاران 1381). قارچ‌ها منبع مواد با ارزشی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. بشر هزاران سال است که از مخمرها در تخمیر خمیر نان و از قارچ‌های خوراکی برای تغذیه و به عنوان دارو در طب

مقدمه

قارچ‌ها گروه بسیار بزرگی از موجودات را تشکیل می‌دهند که در هر موقعیت اکولوژیک یافت می‌شوند. تعداد گونه‌های قارچ 1/5 میلیون تخمین زده

(6، 7، 8 و 9) قرار گرفتند. به منظور تهیه‌ی محلول کلشی‌سین، کلشی‌سین در غلظت‌های مورد نظر به محیط کشت مایع زاپک¹ (تویاما و تویاما 1994) بشرح $(2g) + K_2HPO_4 (1g) + MgSO_4.7H_2O (0/5g) + (KCl (0/5g) + FeSO_4.7H_2O (1\%NaNO_3))$ حاوی گلوکز $(w v^{-1}) 1\%$ و پیتون $(w v^{-1}) 0/5\%$ اضافه شد (تویاما و تویاما 1994). هسته‌ها با رنگ سافرانین-او رنگ‌آمیزی شد (باندونی 1979). هسته‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس اولیمپوس ای-ایکس 170² مجهز به دوربین دیجیتالی د-پ 50 مورد بررسی قرار گرفت و قطر آنها اندازه‌گیری گردید. قطر 50 هسته برای هر ترکیب تیماری در هر تکرار اندازه‌گیری و میانگین قطر این تعداد هسته در تجزیه داده‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه‌ی اسپان و کشت آن در کمپوست

ابتدا بذور گندم به مدت 2 ساعت در آب خیسانده و 15 دقیقه جوشانده شد. سپس به نسبت $W^{-1} 2\%$ وزن گندم خشک پودر کربنات کلسیم و به همین نسبت پودر سولفات کلسیم به بذور پخته اضافه و بذور گندم در دمای $121^\circ C$ و فشار $1/2 psi$ به مدت 2 ساعت اتوکلاو شدند. بذور گندم پخته در شرایط استریل با میسلیم تلقیح شد. بعد از گذشت 10 روز در دمای $28^\circ C$ میسلیم سطح بذور گندم را پوشاند. اسپان تولید شده در بستر کاه و کلش گندم به نسبت $2/5\%$ کشت و در دمای $26^\circ C$ نگهداری شد. بعد از گذشت 20 روز سطح اغلب کیسه‌ها سفید شد و بر روی کیسه‌ها 10 برش ایجاد گردید و در سالی با دمای $^\circ C$ 22 و رطوبت 85-90% نگهداری شد. حدود 7 روز بعد از برش کیسه‌ها، اشکال اولیه قارچ در محل‌های برش ظاهر شد.

گیاهی استفاده می‌کند. قارچ‌های خوراکی گروهی از قارچ‌های کلاه‌دار هستند که حاوی ترکیبات غنی از پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین‌ها و املاح معدنی هستند. قارچ *P. ostreatus* از قارچ‌های خوراکی تجاری است که به صورت صنعتی کشت می‌شود. قارچ صدفی پس از قارچ دکمه‌ای، دومین مقام را از نظر مقدار تولید جهانی دارا است و 25% تولید جهانی را شامل می‌شود (چانگ 1996). قارچ صدفی علاوه بر مصارف خوراکی دارای مصارف دارویی نیز می‌باشد و از صفات دارویی آن می‌توان به افزایش فعالیت لمفوسیت‌های ماکروفاژ، کاهش کلسترول، تغییر سوبسترای برخی سموم و افزایش فعالیت مواد ضد سرطان کبد اشاره کرد (هورن 2002).

سطح ژنوم نقش مهمی در تکامل گونه‌های گیاهی بازی کرده است (فارسی و باقری 1377). در سال‌های اخیر اتوپلی‌پلوئیدی به عنوان یک روش اصلاحی در اصلاح گیاهان زینتی (وان تولی و لیم 2003) و قارچ‌های خوراکی و صنعتی استفاده شده است (تویاما و تویاما 1994). اتوپلی‌پلوئیدی در قارچ صنعتی *Trichoderma ressei* باعث افزایش ترشح سلولاز خارج سلولی (تویاما و تویاما 1990) و در *P. ostreatus* سبب افزایش رشد میسلیمی شده است (تویاما و تویاما 1994) و انتظار می‌رود که این روش در کاهش دوره‌ی رشد و افزایش عملکرد مفید باشد. هدف از این بررسی، امکان ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی و تأثیر آن روی عملکرد و سایر خصوصیات مورفولوژیکی در قارچ خوراکی صدفی *P. ostreatus* بود.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی نژاد و ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی

اسپور قارچ *P. ostreatus* در محیط کشت MEA کشت و به مدت 7 روز در دمای $27^\circ C$ نگهداری شد. قطعات میسلیم حاصل از رشد اسپور، تحت تأثیر چهار غلظت محلول کلشی‌سین (صفر، 0/05، 0/1 و 0/3%)، چهار مدت زمان تیمار نمونه‌ها در محلول کلشی‌سین (6، 12، 18 و 24 ساعت) و چهار pH متفاوت

¹Czapek

²Olympus IX170

اندازه‌گیری عملکرد و صفات مورفولوژیک

عملکرد، قطر کلاهک، طول ساقه، رنگ و طعم برای ترکیبات تیماری در سه تکرار یادداشت‌برداری شد. برای اندازه‌گیری عملکرد، بعد از هر بار برداشت در هر کیسه وزن مربوط به هر ترکیب تیماری اندازه‌گیری و وزن محصول چین‌های بعدی به آن اضافه شد و عملکرد هر کیسه به صورت گرم بر کیسه 4 کیلوگرمی ثبت گردید. برای اندازه‌گیری بزرگترین قطر کلاهک، ساقه و نسبت بزرگترین قطر کلاهک به طول ساقه از هر ترکیب تیماری اندازه قطر کلاهک و ساقه برای 10 قارچ رسیده به طور تصادفی ثبت شد.

نتایج

قطر هسته

نتایج تجزیه واریانس برای قطر هسته نشان داد که بین غلظت‌های محلول کلشیسین و نیز بین مدت زمان‌های تیمار میسلیم‌ها با کلشیسین اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 5% وجود دارد (جدول 1). مقایسه میانگین بین غلظت‌های مختلف کلشیسین از نظر اندازه قطر هسته (شکل 1) نشان داد که بین غلظت‌های 0/05، 0/1 و 0/3% اختلاف معنی‌داری وجود ندارد در حالیکه همگی نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. همچنین در مورد اثر مدت زمان تیمار با کلشیسین دیده شد که مدت زمان‌های 12، 18 و 24 ساعت با هم اختلاف معنی‌داری ندارند ولی همگی بامدت زمان 6 ساعت اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل 2).

میزان محصول قارچ

نتایج تجزیه واریانس برای عملکرد قارچ (جدول 1) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف تیمارهای غلظت کلشیسین وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین غلظت‌های مختلف کلشیسین (شکل 3)

حاکی از آن بود که بین سطوح مختلف غلظت کلشیسین (0/05، 0/1 و 0/3%) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی همگی نسبت به تیمار شاهد (غلظت 0%) اختلاف معنی‌داری داشت.

قطر کلاهک

با توجه به نتایج جدول 1 اثر متقابل مدت زمان اعمال تیمار و pH برای اندازه قطر کلاهک در سطح احتمال 5% معنی‌دار شد. با توجه به شکل 5 ترکیب غلظت 0/05% با $pH = 8$ بیشترین قطر کلاهک را به خود اختصاص داد. با وجود این اختلاف آن فقط با تیمار شاهد معنی‌دار بود.

میانگین طول پایه

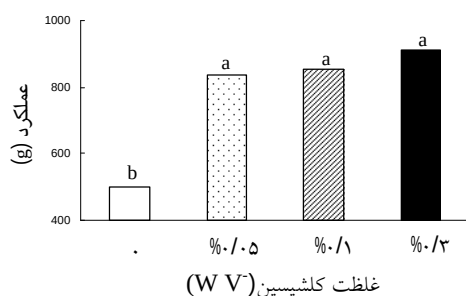
اثر سطوح مختلف غلظت محلول کلشیسین، مدت زمان اعمال تیمار و pH محیط کشت روی اندازه طول پایه معنی‌دار نشد. طول پایه بلند یک صفت نا مطلوب به شمار می‌رود و با توجه به اینکه نتایج حاصل افزایش قطر کلاهک و عملکرد را تأیید کرد، بنابراین، ممکن است اختلاف عملکرد در سطوح مختلف غلظت محلول کلشیسین در اثر افزایش قطر کلاهک باشد.

نسبت قطر کلاهک به طول پایه

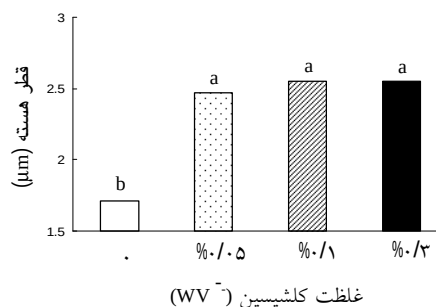
اثر سطوح مختلف عوامل مورد بررسی روی نسبت قطر کلاهک به طول پایه معنی‌دار نشد. بنابراین سه فاکتور مورد نظر در محدوده‌ی مورد بررسی روی نسبت قطر کلاهک به طول پایه قارچ تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشتند.

جدول 1- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلسی‌سین، مدت زمان تیمار و میزان pH بر ویژگی‌های قارچ صدفی

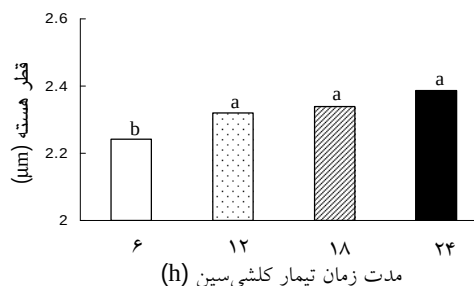
میانگین مربعات						درجه آزادی	منبع تغییرات
نسبت قطر	طول پایه	کلاهک به طول پایه	عملکرد	وزن خشک	قطر هسته		
قطر کلاهک							
14/778*	0/034 ^{ns}	0/118*	1166505*	0/002 ^{ns}	0/652 ^{ns}	2	تکرار
0/399 ^{ns}	0/008 ^{ns}	0/001 ^{ns}	16259 ^{ns}	0/002 ^{ns}	0/176*	3	مدت زمان تیمار (T)
0/305 ^{ns}	0/024 ^{ns}	0/012 ^{ns}	11334 ^{ns}	0/004 ^{ns}	0/876 ^{ns}	3	pH
1/276 ^{ns}	0/041 ^{ns}	0/024 ^{ns}	1650522*	0/002 ^{ns}	8/024*	3	غلظت (C)
0/711 ^{ns}	0/023 ^{ns}	0/010 ^{ns}	71556 ^{ns}	0/002 ^{ns}	0/056 ^{ns}	9	pH × T
1/422*	0/081 ^{ns}	0/024 ^{ns}	91883 ^{ns}	0/003 ^{ns}	0/013 ^{ns}	9	pH × C
0/513 ^{ns}	0/021 ^{ns}	0/011 ^{ns}	106233 ^{ns}	0/003 ^{ns}	0/044 ^{ns}	9	T × C
0/671 ^{ns}	0/030 ^{ns}	0/010 ^{ns}	71553 ^{ns}	0/001 ^{ns}	0/026 ^{ns}	27	pH × T × C
0/620	0/048	0/016	77874	0/003	0/031	126	خطا
						192	کل

*، ^{ns} به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5٪.

شکل 3- میانگین وزن محصول قارچ صدفی (g) به ازای یک کیسه چهار کیلوگرمی کمپوست در سطوح مختلف غلظت کلسی‌سین. میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% دارند (آزمون دانکن).



شکل 1- میانگین قطر هسته‌های قارچ صدفی (μm) در غلظت‌های مختلف کلسی‌سین. میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% دارند (آزمون دانکن).



شکل 2- میانگین قطر هسته (μm) در زمان‌های مختلف تیمار میسلیم‌های قارچ صدفی با محلول کلسی‌سین. میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5% دارند (آزمون دانکن).

رنگ و طعم

هیچ تغییری در رنگ و طعم در سطوح مختلف فاکتورها مشاهده نشد.

درصد ماده‌ی خشک

براساس این نتایج، اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین میانگین سطوح مختلف سه فاکتور مورد بررسی از نظر درصد ماده‌ی خشک مشاهده نشد.

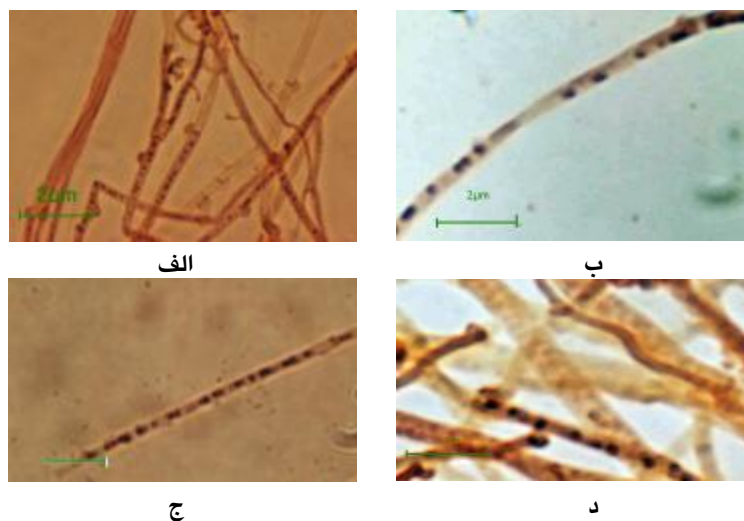
بحث

با توجه به اینکه افزایش اندازه قطر هسته در قارچ *P. ostreatus* رابطه مستقیمی با افزایش محتوی DNA و به عبارتی با سطح پلوئیدی دارد (تویاما و تویاما 1994) و همچنین مساحت هسته دارای چنین نسبتی با مقدار DNA هسته‌ای در یوکاریوت‌های دیگر مانند گندم است (کریمزاده 1996)، افزایش میانگین قطر هسته‌ی میسلیم‌های تیمار شده با کلشیسین نسبت به شاهد در این آزمایش بیانگر افزایش مقدار DNA در هسته‌ی میسلیم‌های تیمار شده با کلشیسین در تمام غلظت‌های مورد بررسی می‌باشد. در آزمایشی که توسط تویاما و تویاما (1994) انجام شد در بین سه غلظت 0/001، 0/01 و 0/1٪، غلظت 0/1٪ به عنوان بهترین غلظت معرفی شد. در آزمایش حاضر، سه غلظت در محدوده‌ی کوچتری در اطراف 0/1٪ مورد بررسی قرار گرفت و بار دیگر غلظت 0/1٪ به همراه 0/05 و 0/3٪ به عنوان غلظت مناسب معرفی می‌گردد. نتایج به دست آمده در این بخش با نتایج حاصل از آزمایش تویاما و تویاما (1994) مطابقت دارد.

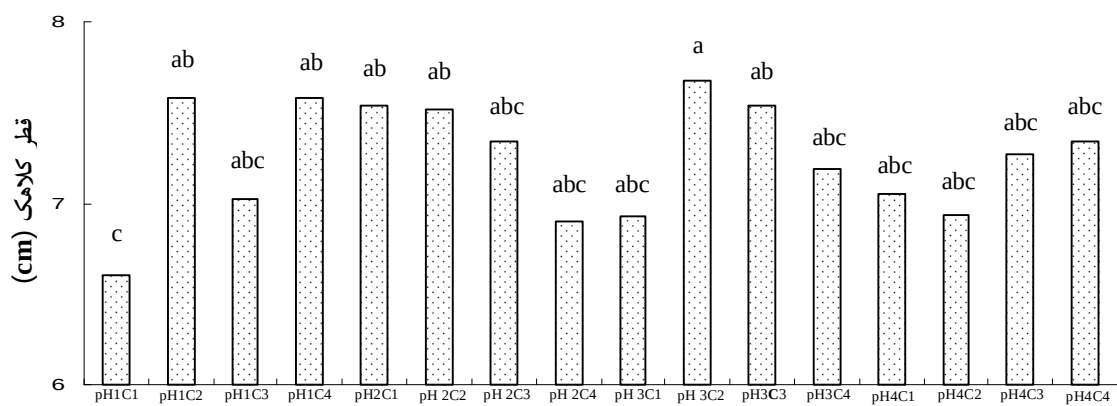
با توجه به اینکه قطر هسته‌ی میسلیم‌های تیمار شده در زمان‌های 12، 18 و 24 افزایش معنی‌داری نسبت به مدت زمان 6 ساعت نشان داد (شکل 2) و این سه زمان تیمار دهی تاثیر یکسانی بر افزایش قطر هسته داشتند. مدت زمان 12 ساعت به علت کوتاهتر بودن به عنوان بهترین مدت زمان تیمار میسلیم‌ها با کلشیسین

به منظور ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی در *P. ostreatus* معرفی می‌شود. در بررسی اثر غلظت (0/01٪) کلشیسین روی میسلیم‌های *P. ostreatus* در صفر، 8، 16، 24، 72 و 120 ساعت که توسط تویاما و تویاما (1994) ارائه گردیده، مدت زمان 16 ساعت به عنوان بهترین مدت زمان اعمال تیمار کلشیسین برای به دست آوردن بیشترین هسته‌های بزرگ تعیین شد. نتایج به دست آمده از آزمایش حاضر اختلاف معنی‌داری بین مدت 12 و 18 ساعت نشان نداد. تیمار 16 ساعت و نیز بین این دو زمان قرار دارد و احتمال می‌رود که بین اندازه‌ی قطر هسته‌ی میسلیم‌های تیمار شده در این سه زمان اختلافی وجود نداشته باشد و در نتیجه 12 ساعت به عنوان کوتاهترین و در نتیجه بهترین مدت زمان اعمال تیمار کلشیسین برای ایجاد اتوپلی‌پلوئیدی در میسلیم‌های قارچ صدفی *P. ostreatus* معرفی می‌شود.

بین عملکرد محصول به دست آمده از شاهد و محصول حاصل از کشت میسلیم‌های تیمار شده با کلشیسین اختلاف معنی‌داری وجود داشت. غلظت‌های 0/05 و 0/1٪ کلشی سین 70٪ و غلظت 0/03٪ عملکرد را 82٪ نسبت به شاهد افزایش دادند. با توجه به اینکه گزارش دیگری در مورد بررسی عملکرد قارچ صدفی تیمار شده با کلشیسین وجود ندارد. براساس نتایج آزمایش حاضر برای اولین بار غلظت 0/05، 0/1 و 0/3٪ کلشیسین، به عنوان بهترین غلظت‌ها برای تولید قارچ صدفی با عملکرد بالا پیشنهاد می‌شوند. اندازه‌ی قطر کلاهک حاصل از میسلیم‌های تیمار شده در غلظت 0/05٪ در pH=8 بیشتر از سایر ترکیبات تیماری بود و این ترکیب سبب افزایش قطر کلاهک تا 1 سانتی متر در قارچ صدفی شد.



شکل 4- تصاویر میسلیم‌های رنگ آمیزی شده قارچ صدفی (تیمار شده در $\text{pH} = 8$ به مدت 18 ساعت)
الف : شاهد؛ ب : تیمار شده در محلول کلشی‌سین با غلظت 0/05%؛ ج : تیمار شده در غلظت 0/1%؛ د : تیمار شده در غلظت 0/3% . مقیاس: $2 \mu\text{m}$.



ترکیب pH و غلظت کلشی‌سین (C)

شکل 5- میانگین قطر کلاهک (cm) قارچ صدفی در ترکیب سطوح مختلف pH و غلظت تیمار کلشی‌سین
 C_1 و C_2 و ... به ترتیب غلظت صفر، 0/05، 0/1 و 0/3 درصد کلشی‌سین
 pH_1 ، pH_2 و ... به ترتیب 6، 7، 8 و 9