

Investigating the Effect of Sodium Azide and Nitrous Acid on the Morphological Characteristics of *Monascus Purpureus* and Pigment Production

Reyhane Kolahdozan

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, reyhane.kolahdozan@yahoo.com

Mahshid Jahadi*

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, mahshidjahadi@gmail.com

Nafiseh-sadat Naghavy

Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, nafiseh_naghavy@yahoo.com

Mohammad-Ali Zia

Department of Basic Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, m.zia@khuif.ac.ir

Abstract

Introduction: *Monascus purpureus* is a filamentous ascomycetes fungus that has the ability to produce natural pigments. The aim of the present study was to investigate the effects of mutagenic chemical agents of Sodium Azide and Nitro Acid on the morphology of *Monascus purpureus* and stable pigment production by this fungus.

Materials and methods: Initial sporulation of *Monascus purpureus* was affected by chemical mutagens (Sodium Azide and Nitrous Acid). Then, the morphological features (appearance and microscopy) of the suspected colonies were examined. Wild and selected colonies were cultured under the submerge fermentation for up to two generations to measure biomass and pigment under immersion conditions.

Results: The production of biomass and yellow, orange, and red pigments in the first and second generation of NA2 (nitrous acid, 0.4 M, 45 min), NA3 (nitrous acid, 0.4 M, 30 min), and NA6 (nitrous acid, 0.2 M, 30 min) samples did not change significantly ($P < 0.05$). NA2 sample significantly produced the maximum amount of pigment ($P < 0.05$). The concentrations of yellow, orange, and red pigments produced by this sample were 0.64, 0.42, and 0.45 units per milliliter, respectively.

Discussion and conclusion: In the present study, the morphology of all selected samples showed changes compared to the wild sample. Most of the selected samples produced significantly more pigments than the wild strain which were stable for up to two generations ($P < 0.05$). The treatment method of *Monascos purpureus* with nitrous acid can successfully lead to the production of samples with higher and more stable pigment production.

Key words: *Monascus purpureus*, Mutagenic agents, Morphology, Pigment

* Corresponding author

Received: October 3, 2020 / **Accepted:** January 6, 2021

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم دهم، شماره ۳۸، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۲۸-۱۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۱۷

Doi: [10.22108/BJM.2021.125043.1327](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.125043.1327)

بررسی تأثیر سدیم آزید و اسید نیترو بر خصوصیات مورفولوژیکی موناسکوس پورپورئوس و تولید رنگدانه

ریحانه کلاه‌دوزان: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران،

reyhane.kolahdozan@yahoo.com

مهشید جهادی*: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران،

mahshidjahadi@gmail.com

نقیسه سادات نقوی: استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، nafiseh_naghavy@yahoo.com

محمدعلی ضیا: دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده دندانپزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، m.zia@khuisf.ac.ir

چکیده

مقدمه: موناسکوس پورپورئوس یک قارچ آسکومیست رشته‌ای است که توانایی تولید رنگدانه‌های طبیعی را دارد. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر عوامل شیمیایی جهش‌زای سدیم آزید و اسید نیترو بر مورفولوژی قارچ موناسکوس پورپورئوس و تولید پایدار رنگدانه توسط این قارچ است.

مواد و روش‌ها: ابتدا سوسپانسیون اسپوری قارچ موناسکوس پورپورئوس تحت تأثیر عوامل جهش‌زای شیمیایی (سدیم آزید و اسید نیترو) قرار گرفت. سپس ویژگی‌های مورفولوژیکی (ظاهری و میکروسکوپی) پرگنه‌های مشکوک بررسی شدند. از بین این پرگنه‌ها آنهایی که تغییرات بیشتری نسبت به سویه وحشی داشتند یا رنگدانه بیشتری تولید کرده بودند، تا دو نسل برای اندازه‌گیری زیست‌توده و رنگدانه در شرایط غوطه‌وری بررسی شدند.

نتایج: با استفاده از مواد جهش‌زا نمونه‌هایی مشاهده شدند که مورفولوژی آنها نسبت به سویه وحشی تفاوت داشتند و این نمونه‌ها به‌طور معنی‌داری رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند ($P < 0/05$). تولید زیست‌توده و رنگدانه‌های زرد، نارنجی و قرمز در نسل اول و دوم در نمونه‌های NA2 (اسید نیترو، ۰/۴ مولار، زمان ۴۵ دقیقه)، نمونه NA3 (اسید نیترو، ۰/۴ مولار، زمان ۳۰ دقیقه) و نمونه NA6 (اسید نیترو، ۰/۲ مولار، زمان ۳۰ دقیقه) به‌طور معنی‌داری تغییر نکردند ($P < 0/05$). نمونه NA2 به‌طور معنی‌داری بیشترین میزان رنگدانه را تولید کرد ($P < 0/05$). غلظت رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز تولیدشده توسط این نمونه به ترتیب ۰/۶۴، ۰/۴۲ و ۰/۴۵ واحد در هر میلی‌لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر مورفولوژی تمامی نمونه‌های انتخاب‌شده، نسبت به نمونه وحشی تغییراتی را نشان دادند. بیشتر نمونه‌های انتخاب‌شده به‌طور معنی‌داری رنگدانه بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند که در برخی از آنها این مشخصه تا دو نسل پایدار بودند ($P < 0/05$). روش تیمار موناسکوس پورپورئوس با اسید نیترو به‌طور موفقیت‌آمیزی به تولید نمونه‌هایی با تولید رنگدانه بیشتر و پایدار منجر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: موناسکوس پورپورئوس، عوامل جهش‌زا، مورفولوژی، رنگدانه

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

قارچ‌های آسکومیست رشته‌ای از جمله موجوداتی‌اند که بیشتر در فرایندهای بیوتکنولوژی صنعتی استفاده می‌شوند. بیشتر این قارچ‌ها در شاخه آسکومایکوتا طبقه‌بندی می‌شوند (۱). قارچ *موناسکوس* یک نوع قارچ آسکومیست رشته‌ای است که ژنوم آن متعلق به کلاس آسکوماست‌ها و خانواده *موناسکاسه* است. این قارچ منبعی از متابولیت‌های ثانویه با ساختار پلی‌کتیدی است که حداقل شش رنگدانه یعنی دو نوع رنگدانه زرد، دو نوع رنگدانه نارنجی و دو نوع رنگدانه قرمز تولید می‌کند (۲، ۳). این رنگدانه‌ها مجموعه‌ای از متابولیت‌های قارچی به نام آزافیلون‌ها هستند (۴) و چندین کاربرد در صنایع غذایی مانند تولید سوسیس چینی، نودل‌های فوری و محصولات لبنی دارند و در صنایع گوشت نیز به‌جای نمک نیترات، پیش‌ساز نیتروز آمین‌ها، استفاده می‌شوند (۵). از میان این رنگدانه‌ها، رنگدانه قرمز قرنهاست که به‌عنوان ماده رنگی خوراکی در آسیا به‌طور گسترده استفاده شده است و اکنون نیز به‌وسیله تخمیر با موفقیت تولید می‌شود (۶). یکی از مهم‌ترین چالش‌های استفاده از قارچ‌های رشته‌ای مانند *موناسکوس* برای تولید متابولیت‌های قارچی، کنترل مورفولوژی میسلیم‌هاست. این ویژگی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا مورفولوژی قارچ بر عملکرد تولید متابولیت‌های هدف در طول تخمیر غوطه‌وری تأثیر می‌گذارد. مورفولوژی میسلیم به‌طور چشمگیری تأثیر گرفته از شرایط تخمیر مانند منابع کربن، pH، میزان مخلوط‌شدن، طراحی اسپارژر و میزان هوادهی است (۷). هاگ‌زایی غیرجنسی یک روش تولید مثلی رایج برای گونه‌های *موناسکوس* است. اندازه و شکل اسپورها و پرگنه‌های قارچ‌های رشته‌ای از عوامل

مهم در شناسایی قارچ‌ها هستند (۸). *موناسکوس* را به راحتی می‌توان با آسکوسپورهای آن تشخیص داد که از نظر شکل به قطر ۵ میکرون هستند. میسلیم در مراحل اولیه سفید است و به‌سرعت به یک رنگ غنی و متعاقباً به یک رنگ زرد - نارنجی تغییر می‌کند (۹). جهش میکروارگانیسم‌های مهم صنعتی برای توسعه موفقیت‌آمیز سویه‌های مختلف مورد نیاز در تولید محصولات مختلف زیستی مهم است (۱۰). پیش از این، تحقیقات دیگری در زمینه ایجاد جهش بر قارچ *موناسکوس پورپورئوس* انجام شده است. در مطالعه دیکشیت و تالاپراگادا، قارچ *موناسکوس* در معرض عوامل جهش‌زای اشعه ماوراءبنفش و اتیل‌متان‌سولفونات قرار گرفت و مورفولوژی سویه‌های جهش‌یافته نسبت به سویه وحشی تفاوت داشت. همچنین سویه‌های جهش‌یافته، لواستاتین و رنگدانه بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند (۱۱). در مطالعه دیگری که قارچ *موناسکوس* در معرض اشعه ماوراءبنفش قرار گرفت، سویه‌های جهش‌یافته چند برابر رنگدانه بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند (۱۲). با توجه به اینکه استفاده از مواد شیمیایی جهش‌زا نسبت به سایر روش‌ها ارزان‌تر و راحت‌تر است، می‌تواند نتایج بهتری در افزایش تولید محصول مدنظر نسبت به سایر روش‌های ژنتیکی پرهزینه‌تر ارائه دهد؛ از این‌رو در این مطالعه، سوسپانسیون قارچی *موناسکوس پورپورئوس* در معرض عوامل جهش‌زای سدیم آزید و اسید نیترو قرار گرفت و ویژگی‌های مورفولوژی و تولید رنگدانه بررسی شدند.

مواد و روش‌ها

مواد: قارچ *موناسکوس پورپورئوس* ATCC 16362

از سازمان تحقیقات علمی و صنعتی ایران، تهیه و روی

Toup view (version: X64, 4.8.16143. 20191216) بررسی و اندازه گیری شد (۱۴، ۱۸، ۱۹).

کشت غوطه‌وری: سوسپانسیون اسپوری نمونه‌های انتخاب شده در یک حمام آب در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه قرار گرفت (۱۳، ۲۰). به منظور اندازه‌گیری زیست توده و رنگدانه این سوسپانسیون در محیط پودر مخمر - نشاسته محلول، تلقیح و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ روز در انکوباتور شیکردار نگهداری شد (۲۱، ۲۲).

استخراج و اندازه‌گیری رنگدانه: محتویات ارلن با الکل ۷۰ درصد مخلوط شد و در حمام اولتراسونیک و سپس در گرمخانه شیکردار قرار گرفت و سانتریفیوژ شد. پس از آن، با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (ساخت انگلستان)، صاف و غلظت رنگدانه در سه طول موج ۴۰۰، ۴۷۰ و ۵۰۵ نانومتر به ترتیب برای رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز با اسپکتوفومتر بررسی شد (۷، ۲۳).

اندازه‌گیری زیست توده: ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیزم کشت داده شده با استفاده از کاغذ صافی به وزن رسیده صاف شد و در آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، خشک و با ترازوی دیجیتال وزن شد. اختلاف وزن قبل و بعد کاغذ محاسبه شد (۷).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور بررسی پایدار بودن نمونه‌های انتخاب شده از طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 و براساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت.

نتایج

تأثیر عوامل شیمیایی بر ویژگی‌های ظاهری: با توجه به جدول ۱ و شکل ۱، در سویه موناسکوس پورپورئوس

محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شد و به مدت ۷ روز در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس در یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد (۱۳). همچنین، تمامی مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

تهیه سوسپانسیون اسپوری: به محیط کشت جامد ۷ روزه آب مقطر استریل اضافه شد و اسپورها برداشته شدند. شمارش اسپورها با لام ثوبار، انجام و غلظت سوسپانسیون اسپوری به میزان $10^6 \times 1/5$ اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم شد (۱۴، ۱۵).

اعمال تیمار اسید نیترو و سدیم آزید: اسید نیترو با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ و ۰/۸ مولار به مدت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه به اسپورهای موناسکوس اضافه شد. برای تیمار با سدیم آزید، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید به مدت ۶۰ و ۹۰ دقیقه به رسوب‌ها اضافه شد. سپس سلول‌ها سانتریفیوژ شدند و ماده روی حذف شد. در مرحله بعد، بافر فسفات به سلول‌های جدا شده اضافه شد و مجدداً توسط سانتریفیوژ شستشو داده شدند. این کار سه بار تکرار شد و اسپورها در بافر فسفات به حالت محلول درآمده و روی محیط PDA کشت شدند (۱۶، ۱۷).

بررسی تأثیر ماده جهش‌زا بر ویژگی‌های مورفولوژی قارچ: پرگنه‌های با خصوصیات ظاهری متفاوت، انتخاب و روی محیط PDA کشت شدند و به مدت ۷ روز در گرمخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از روز دوم تا هفتم مشخصات پرگنه‌های جهش‌یافته نسبت به سویه وحشی بررسی و ثبت شد (۱۱). در روز هفتم تمام ویژگی‌های میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری نیکون (E100) ساخت ژاپن بررسی شد. قطر میسلیم با استفاده از دوربین دیجیتال و نرم‌افزار

اندازه‌گیری شد (شکل ۱).

همان‌طور که در شکل ۲ سویه NA3 (غلظت اسید نیترو: ۰/۴ مولار و مدت زمان: ۳۰ دقیقه) نشان داده شده است، رنگ سطح پرگنه در تیمار NA3 به صورت یکنواخت، نارنجی و رنگ پشت پرگنه به صورت یکنواخت قهوه‌ای تیره بود و هاله خلی باریک زردی در پشت پرگنه قارچ دیده شد. پرگنه، برجسته و نسبت به سویه وحشی کاهش اندازه چشمگیری داشت. حداکثر افزایش قطر پرگنه در روز سوم تا چهارم بود و قطر پرگنه در روز هفتم ۱۴ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. اطراف پرگنه موج‌دار بود.

رنگ سطح پرگنه در تیمار NA4 (غلظت اسید نیترو: ۰/۲ مولار و مدت زمان: ۳۰ دقیقه)، قهوه‌ای و نارنجی بود و حالت درهم پخش‌شدگی داشت. در پشت پرگنه رنگ به صورت حلقوی و در مرکز قرمز خلی تیره، قرمز، سپس نارنجی و هاله زرد مشاهده شد. سطح پرگنه تورفتگی داشت. حداکثر افزایش قطر پرگنه در روز سوم تا چهارم دیده شد که در روز چهارم حدود ۹ میلی‌متر نسبت به روز قبل افزایش داشت. اندازه پرگنه در روز هفتم ۵ میلی‌متر نسبت به سویه وحشی کاهش یافته بود (شکل ۲).

در تیمار NA5، تأثیر گرفته از اسید نیترو با غلظت ۰/۲ مولار به مدت ۳۰ دقیقه، پرگنه به صورت پرزی و برآمده بود. در سطح پرگنه، رنگ نارنجی روشن و نارنجی تیره‌تر حالت درهم پخش‌شدگی داشتند. پشت پرگنه رنگ به صورت حلقوی و در مرکز قرمز خلی تیره، قرمز و نارنجی بود. اطراف پرگنه تقریباً صاف بود، افزایش اندازه پرگنه از روز دوم تا پنجم روند تقریباً یکنواختی داشت، از روز پنجم تا ششم هیچ تغییری مشاهده نشد و از روز ششم تا هفتم تنها ۱ میلی‌متر به

وحشی در سطح پلیت پرگنه‌ها تقریباً بدون رنگ بودند و در مرکز پرگنه رنگ نارنجی خلی ملایمی مشاهده شد. رنگ پشت پرگنه به صورت حلقوی با هاله سفید پهن بود. شکل پرگنه، پرزی و سطح تمام پرگنه، صاف و در مرکز برآمده بود. افزایش اندازه قطر پرگنه در هر روز روند تقریباً یکنواختی داشت. اندازه پرگنه‌ها بزرگ بود؛ به طوری که قطر سویه وحشی در روز هفتم ۳۵ میلی‌متر اندازه‌گیری شد.

در پرگنه انتخاب‌شده که با ۰/۲ مولار اسید نیترو به مدت ۴۵ دقیقه تیمار شده بود، رنگ سطح پرگنه، نارنجی پررنگ و در سطح کل پرگنه یکنواخت بود. رنگ پشت پرگنه قرمز تیره و یکنواخت بود و هاله خلی باریک و شفافی مشاهده شد. بافت پرگنه پرزی و برآمدگی در کل پرگنه وجود داشت. اندازه قطر پرگنه در روز دوم تا چهارم، در هر روز ۴ میلی‌متر افزایش یافت؛ در حالی که از روز چهارم تا هفتم این افزایش قطر پرگنه، کمتر و در هر روز ۱ یا ۲ میلی‌متر پرگنه بزرگ‌تر شد. پرگنه انتخاب‌شده کوچک بود و حدود ۶ میلی‌متر کاهش قطر نسبت به سویه وحشی در آن مشاهده شد (شکل ۱).

در تیمار NA2، تأثیر گرفته از اسید نیترو با غلظت ۰/۴ مولار به مدت ۴۵ دقیقه، رنگ در سطح کل پرگنه نارنجی تیره بود و فقط هاله خلی باریک سفیدی مشاهده شد. رنگ پشت پرگنه به صورت حلقوی و در مرکز قرمز خلی تیره و پس از آن، نارنجی و زرد با هاله باریک سفید بود. سطح پرگنه کاملاً صاف بود. از روز دوم تا چهارم کشت، سرعت افزایش قطر پرگنه بالا بوده است و بیشترین افزایش قطر پرگنه از روز دوم تا سوم دیده شد. از روز چهارم به بعد، سرعت افزایش قطر پرگنه کمتر بود و قطر پرگنه در روز هفتم ۲۰ میلی‌متر

رنگ سطح پرگنه انتخاب شده SA2 (غلظت سدیم آزید: ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و مدت زمان: ۹۰ دقیقه) نارنجی و رنگ پشت پرگنه قرمز تیره با هاله ضخیم نارنجی بود. برآمدگی کمی در مرکز پرگنه دیده شد و اطراف پرگنه تقریباً صاف بود. قطر پرگنه از روز دوم تا چهارم در هر روز ۷ میلی متر و از روز چهارم تا ششم در هر روز ۲ میلی متر افزایش یافت و از روز ششم تا هفتم اندازه پرگنه ثابت ماند. قطر پرگنه در روز هفتم ۲۴ میلی متر اندازه گیری شد (شکل ۳).

در سوئیه SA3، تأثیر گرفته از اسید نیترو با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به مدت ۶۰ دقیقه، با توجه به شکل ۳، سطح پرگنه به صورت کاملاً یکنواخت نارنجی و پشت پرگنه به صورت یکنواخت قرمز تیره بود و فقط در اطراف پرگنه هاله باریک زرد مشاهده شد. پرگنه‌ها برآمده بودند و اطراف پرگنه کاملاً صاف نبود. حداکثر افزایش قطر پرگنه در روز ششم تا هفتم، مشاهده و قطر پرگنه در روز هفتم ۳۰ میلی متر اندازه گیری شد.

تأثیر عوامل شیمیایی بر ویژگی‌های میکروسکوپی:
نتایج حاصل از اعمال تیمارهای سدیم آزید و اسید نیترو بر ویژگی‌های میکروسکوپی نمونه‌های انتخاب شده به شرح زیر است که تصاویر آن در قسمت نمای میکروسکوپی شکل ۱، ۲ و ۳ نمایش داده شده است.

در سوئیه وحشی قارچ موناסקوس پورپورئوس، مطابق با بخش ج شکل ۱، میسلیم‌ها شفاف و دیواره‌ها نازک و ساده بودند. تعداد انشعابات کم بود و آسک در بررسی میکروسکوپی ملاحظه نشد. قطر میسلیم از ۴/۲۴ تا ۶ میکرومتر متغیر بود.

در نمونه NA1 میسلیم‌ها به نسبت زیاد پیچ خورده بودند و قطر متوسط میسلیم‌ها ۲۲/۵ میکرومتر بود.

اندازه قطر پرگنه اضافه شد. قطر پرگنه در روز هفتم ۲۵ میلی متر اندازه گیری شد (شکل ۲).

مطابق با شکل ۲ سوئیه NA6 (غلظت اسید نیترو: ۰/۴ مولار و مدت زمان: ۳۰ دقیقه)، سطح پرگنه نارنجی رنگ بود و روی پرگنه برآمدگی کوچک دیگری دیده شد که همان برآمدگی در پشت پرگنه نیز رنگ خیلی تیره‌ای داشت. رنگ پشت پرگنه به صورت حلقوی و در مرکز قرمز خیلی تیره، نارنجی و با هاله سفید مشاهده شد. پرگنه به صورت پری و برآمده بود، قطر آن از روز سوم تا چهارم ۱۱ میلی متر افزایش داشت و روند افزایش قطر پرگنه در بقیه روزها آهسته تر بود. قطر پرگنه در روز هفتم ۲۷ میلی متر اندازه گیری شد.

در تیمار NA7، تأثیر گرفته از اسید نیترو با غلظت ۰/۴ مولار به مدت ۱۵ دقیقه، پرگنه کاملاً مسطح بود. در سطح پرگنه رنگ به صورت حلقوی و ترکیبی از چند نارنجی (تیره در مرکز پرگنه و روشن در اطراف پرگنه) بود. رنگ پشت پرگنه نیز به صورت حلقوی از قرمز خیلی تیره در مرکز تا نارنجی در اطراف آن بود. همچنین، هاله خیلی باریک و شفاف زردی مشاهده شد. قطر پرگنه از روز دوم تا چهارم در هر روز ۸ میلی متر افزایش یافت و پس از آن، روند افزایش قطر پرگنه سرعت کمتری داشت. قطر پرگنه در روز هفتم ۳۰ میلی متر اندازه گیری شد (شکل ۳).

در تیمار سدیم آزید با غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و زمان ۶۰ دقیقه (SA1)، سطح پرگنه به صورت کاملاً یکنواخت نارنجی و پشت پرگنه به صورت یکنواخت رنگ قرمز تیره با هاله شفاف زرد بود. پرگنه‌ها تقریباً برآمده بودند، قطر پرگنه از روز دوم تا پنجم افزایش یافت و از روز پنجم به بعد ثابت ماند. قطر پرگنه در روز هفتم ۲۰ میلی متر بود (شکل ۳).

تعداد دیوارهٔ عرضی در طول میسلیم زیاد بود و آسک مشاهده نشد که در بخش نمای میکروسکوپی شکل ۱ ملاحظه می‌شود.

جدول ۱- بررسی ویژگی‌های ظاهری پرگنه موناسکوس پورپورئوس

نمونه	زمان (دقیقه)	غلظت مادهٔ جهش‌زا	رنگ سطح	رنگ پشت	بافت	قطر پرگنه (میلی‌متر)					
						روز ۷	روز ۶	روز ۵	روز ۴	روز ۳	روز ۲
وحشی	-	-	نارنجی خیلی ملایم	قرمز، نارنجی، زرد، با هالهٔ پهن سفید	پری و در مرکز برآمده	۹	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵
NA1	۴۵	۰/۲ مولار اسید نیتر و	نارنجی تیره	قرمز تیره با هالهٔ باریک و شفاف	پری و برآمده	۷	۱۱	۱۵	۱۶	۱۷	۱۹
NA2	۴۵	۰/۴ مولار اسید نیتر و	نارنجی تیره	قرمز تیره، نارنجی، زرد، با هالهٔ باریک سفید	پری و صاف	۴	۱۰	۱۵	۱۷	۱۹	۲۰
NA3	۳۰	۰/۴ مولار اسید نیتر و	نارنجی	قهوه‌ای با هالهٔ باریک زرد	پری و برآمده	۱	۴	۹	۱۱	۱۲	۱۴
NA4	۳۰	۰/۲ مولار اسید نیتر و	مرکز قهوه‌ای، نارنجی کم‌رنگ	قرمز خیلی تیره، قرمز، نارنجی، با هالهٔ زرد	پری و با تورفتگی در سطح پرگنه	۷	۱۱	۲۰	۲۴	۲۷	۳۰
NA5	۳۰	۰/۲ مولار اسید نیتر و	نارنجی کم‌رنگ و تیره‌تر	قرمز تیره و قرمز و در اطراف نارنجی	پری و برآمده	۱۰	۱۵	۲۰	۲۴	۲۴	۲۵
NA6	۳۰	۰/۲ مولار اسید نیتر و	نارنجی	قرمز تیره، نارنجی، با هالهٔ سفید	پری و برآمده	۱	۵	۱۶	۲۰	۲۳	۲۷
NA7	۱۵	۰/۴ مولار اسید نیتر و	نارنجی تیره	قرمز تیره، نارنجی تیره، نارنجی روشن، با هالهٔ خیلی شفاف باریک زرد	پری و صاف	۷	۱۵	۲۳	۲۶	۲۹	۳۰
SA1	۶۰	۵۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید	نارنجی تیره	قرمز تیره، با هالهٔ شفاف زرد	پری و برآمده	۹	۱۴	۱۷	۲۰	۲۰	۲۰
SA2	۹۰	۷۵۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید	نارنجی	قرمز تیره با هالهٔ نارنجی	پری و برآمده	۷	۱۴	۲۱	۲۳	۲۴	۲۴
SA3	۶۰	۱۰۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید	نارنجی	قرمز یکنواخت با هالهٔ خیلی باریک زرد شفاف	پری و برآمده	۹	۱۳	۱۹	۲۰	۲۱	۳۰

میکروسکوپی شکل ۲ نشان داده شده است، میسلیم به حالت آرتروکنیدی و کلامیدوسپور کنیدیایی تشکیل شده بود.

تشکیل میسلیم‌ها در نمونه NA7 بسیار کم و محدود بود. مطابق با شکل ۳ در قسمت نمای میکروسکوپی، در برخی نواحی میسلیم‌ها استخوانی شکل بودند. قطر میسلیم در این نمونه ۱۶ تا ۱۷/۸۰ میکرومتر بود.

ساختار میکروسکوپی نمونه SA1 نشان داد انشعابات میسلیومی در این نمونه به شدت افزایش یافته است. قطر میسلیم در طول میسلیم‌ها متغیر بود و در برخی نقاط تورم مشاهده شد. همان‌طور که در قسمت نمای میکروسکوپی شکل ۳ ملاحظه می‌شود، در برخی نقاط قطر سلول میسلیم افزایش یافته است و تا بیش از ۵۰ میکرومتر نیز ملاحظه شد. ورود به فاز تشکیل کلامیدوسپور کنیدیایی در شکل میکروسکوپی ملاحظه می‌شود.

میسلیم‌ها در نمونه SA2 کم تشکیل شده‌اند؛ اما متراکم بودند. تعداد انشعابات در میسلیم، کم و میسلیم در برخی نواحی متورم بود. مطابق با نمای میکروسکوپی شکل ۳، قطر میسلیم از ۲۱/۶۳ تا ۳۴/۲۱ میکرومتر متغیر بود.

در نمونه SA3، همان‌طور که در قسمت نمای میکروسکوپی شکل ۳ مشخص است، تشکیل میسلیم در این نمونه بسیار کم بود و میسلیم‌ها انشعابات کمی داشتند. هیچ ساختاری به غیر از میسلیم مشاهده نشد و قطر میسلیم ۱۰ تا ۱۴/۴۲ میکرومتر متغیر بود.

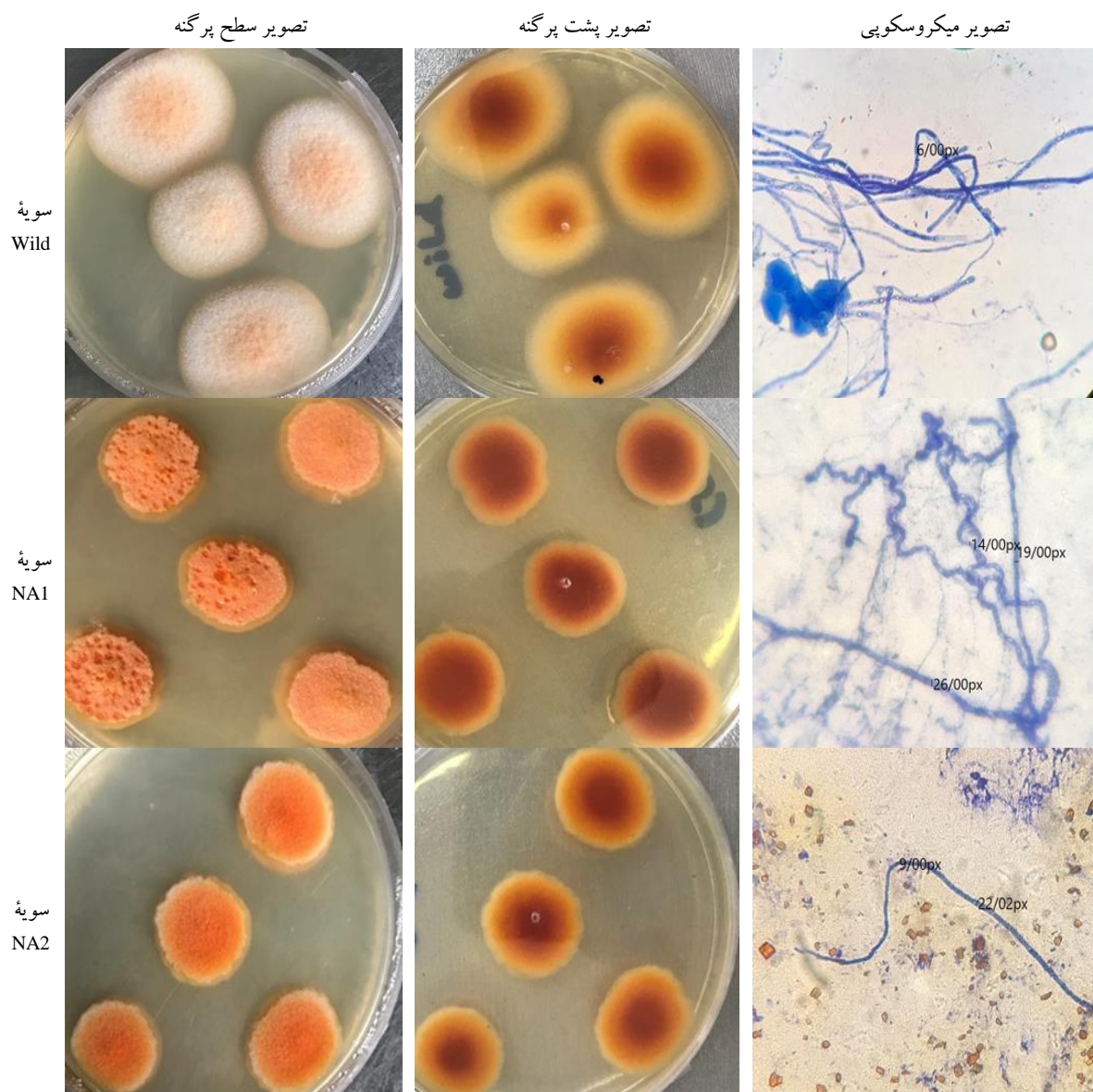
با توجه به بخش نمای میکروسکوپی شکل ۱، تشکیل میسلیم در نمونه NA2 بسیار کم و محدود بود و میسلیم‌ها بدون انشعاب بودند. قطر در طول میسلیم متغیر (۹ تا ۲۲ میکرومتر) بود. تعداد دیواره‌های عرضی، کم و رنگدانه‌های زیادی تشکیل شده بود.

ساختار میکروسکوپی نمونه NA3 نشان داد میسلیم‌ها در این تیمار متراکم شده بودند و انشعابات در میسلیم‌ها کم بود. میسلیم‌ها در برخی نواحی پیچ‌خوردگی داشتند و قطر میسلیم ۲۲/۴۷ تا ۲۸/۶ میکرومتر بود.

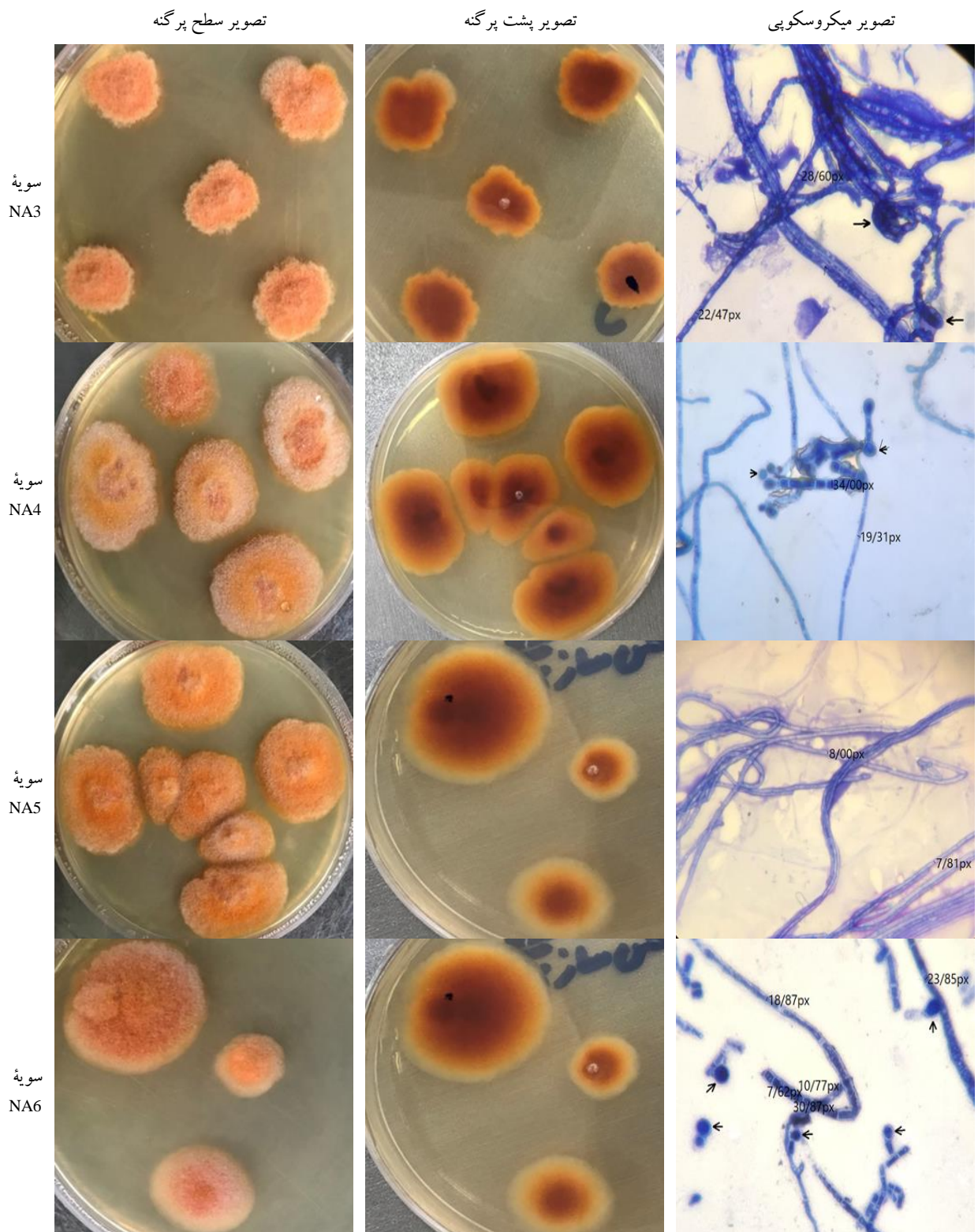
میسلیم‌ها در نمونه NA4 با دیواره‌های ضخیم تشکیل شده بودند. همان‌طور که در قسمت نمای میکروسکوپی شکل ۲ دیده می‌شود در برخی نواحی میسلیم از محل دیواره عرضی قطعه‌قطعه شده بود و کلامیدوسپور کنیدیایی مشاهده شد. قطر میسلیم از ۱۹/۳۱ تا ۳۴ میکرومتر متغیر بود.

در نمونه NA5 میسلیم‌ها متراکم و بالشتکی بودند و تشکیل حالتی شبیه به اسپورودوخیوم دیده شد. انشعابات میسلیومی در این نمونه کم بود و میسلیم‌ها در برخی نواحی تاخوردگی بودند. مطابق با نمای میکروسکوپی شکل ۲، قطر میسلیم نسبت به سایر تیمارها، بسیار کم و حدود ۸ میکرومتر در تمام طول میسلیم بود.

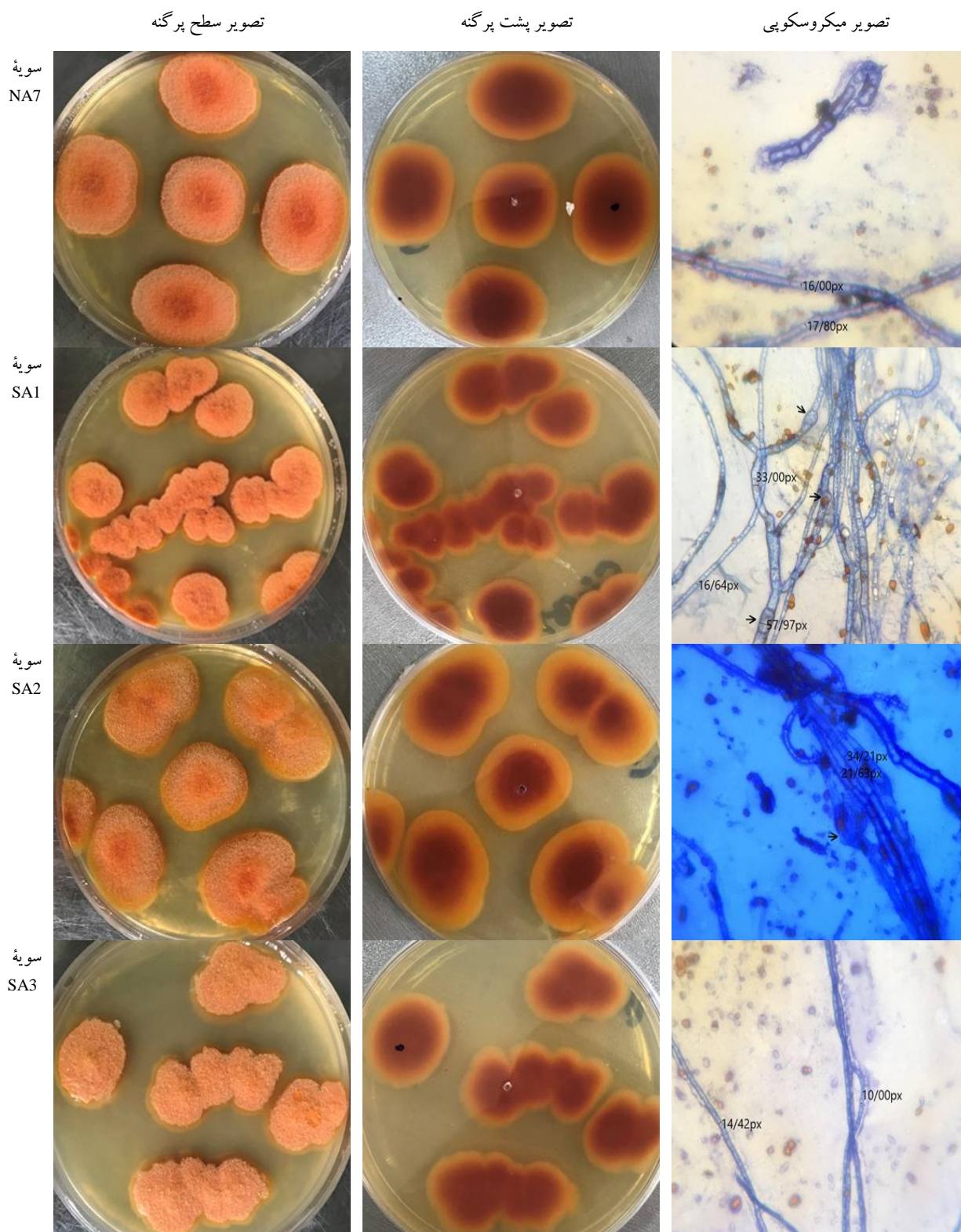
از بین نمونه‌های تیمار شده با اسید نیترو، در نمونه NA6 تعداد میسلیم‌ها کم بود. میسلیم‌ها دیواره عرضی داشتند و در برخی نواحی میسلیم‌ها خرد شده بودند. قطر میسلیم ۱۸/۸۷ تا ۳۰/۸۷ میکرومتر در طول میسلیم متغیر بود. همان‌طور که در بخش نمای



شکل ۱- روز هفتم بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی تیمارهای انتخاب‌شده. تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی ۵۰ درصد



شکل ۲- روز هفتم بررسی ویژگی های مورفولوژی تیمارهای انتخاب شده. تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی ۵۰ درصد



شکل ۳- روز هفتم بررسی ویژگی‌های مورفولوژی تیمارهای انتخاب‌شده. تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی ۵۰ درصد

بررسی پایداری و میزان تولید زیست توده، رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز: براساس جدول ۲، میزان تولید زیست توده در بیشتر نمونه‌های انتخاب شده با نمونه وحشی اختلاف آماری معنی داری نداشت ($P < 0/05$). در تولید رنگدانه زرد بین نمونه‌های انتخاب شده و نمونه موناسکوس پورپورئوس وحشی، اختلاف آماری معنی داری ملاحظه می‌شود ($P < 0/05$). میزان تولید رنگدانه زرد در نمونه‌های انتخاب شده NA2، NA3، NA6، SA1 و SA3 به طور معنی داری بیشتر از نمونه وحشی است ($P < 0/05$). میزان تولید رنگدانه نارنجی در نمونه‌های NA2، NA3، NA6 و NA7 در هر دو نسل به طور معنی داری بیشتر از نمونه وحشی است ($P < 0/05$). نمونه‌های NA2، NA3، NA6 و NA7 در هر دو نسل

به طور معنی داری رنگدانه قرمز بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید می‌کنند ($P < 0/05$). با بررسی میزان تولید زیست توده و رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز طی نسل اول و دوم کشت مشخص شد در نمونه‌های NA2، NA3 و NA6 مانند نمونه وحشی از لحاظ مشخصه‌های بالا اختلاف آماری معنی داری وجود ندارد. همچنین، مقدار زیست توده و رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز تولید شده در نسل اول و دوم تولید همچنان به طور معنی داری تغییر نکرده که نشان دهنده پایداری زیست توده و هر سه رنگدانه در نمونه‌های گفته شده طی دو نسل متوالی است ($P < 0/05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر تیمار بر رشد زیست توده و تولید رنگدانه قرمز، نارنجی و زرد

نمونه	زیست توده (گرم بر لیتر)		رنگدانه زرد (رنگدانه در هر میلی لیتر)		رنگدانه نارنجی (رنگدانه در هر میلی لیتر)		رنگدانه قرمز (رنگدانه در هر میلی لیتر)
	نسل ۱	نسل ۲	نسل ۱	نسل ۲	نسل ۱	نسل ۲	
وحشی	۴/۸۶ ± ۰/۰۴ ab A	۴/۹۴ ± ۰/۰۴ b A	۰/۳۲ ± ۰/۰۰۷ e B	۰/۳۳ ± ۰/۰۰۷ f B	۰/۱۸ ± ۰/۰۰۱ d B	۰/۱۸ ± ۰/۰۰۱ f B	۰/۲۱ ± ۰/۰۰۱ f B
NA2	۴/۷۸ ± ۰/۰۴ b A	۴/۸۰ ± ۰/۱۲ bc A	۰/۶۴ ± ۰/۰۲ b B	۰/۶۵ ± ۰/۰۰۷ c B	۰/۴۲ ± ۰/۰۱ a B	۰/۴۳ ± ۰/۰۰۷ b B	۰/۴۹ ± ۰/۰۳ b B
NA3	۴/۹۹ ± ۰/۰۴ a A	۵/۱۴ ± ۰/۰۴ a A	۰/۵۴ ± ۰/۰۰۲ c B	۰/۵۳ ± ۰/۰۰۹ d B	۰/۳۸ ± ۰/۰۰۱ b B	۰/۳۸ ± ۰/۰۰۲ c B	۰/۴۰ ± ۰/۰۰۶ d B
NA6	۴/۷۵ ± ۰/۲۱ b AB	۴/۸۵ ± ۰/۱۴ bc A	۰/۶۶ ± ۰/۰۰۷ b C	۰/۶۷ ± ۰/۰۱۱ b C	۰/۳۰ ± ۰/۰۳ c B	۰/۳۰ ± ۰/۰۱۲ e B	۰/۴۴ ± ۰/۰۰۳ c B
NA7	۴/۴۹ ± ۰/۱۵ c B	۴/۸۷ ± ۰/۰۲ bc A	۰/۳۱ ± ۰/۰۰۲ e D	۰/۵۳ ± ۰/۰۰۴ d C	۰/۲۰ ± ۰/۰۰۲ d D	۰/۳۵ ± ۰/۰۰۱ d C	۰/۳۵ ± ۰/۰۰۴ e B
SA1	۴/۷۳ ± ۰/۰۴ b A	۴/۷۳ ± ۰/۰۳ c A	۰/۴۷ ± ۰/۰۰۳ d C	۰/۴۴ ± ۰/۰۰۴ e D	۰/۱۹ ± ۰/۰۰۱ d C	۰/۱۱ ± ۰/۰۰۱ g D	۰/۳۲ ± ۰/۰۰۱ e C
SA3	۴/۸۶ ± ۰/۰۳ ab B	۴/۹۲ ± ۰/۰۴ b A	۰/۹۵ ± ۰/۰۰۵ a C	۰/۷۲ ± ۰/۰۰۸ a D	۰/۲۰ ± ۰/۰۰۲ d D	۰/۵۲ ± ۰/۰۰۲ a C	۰/۶۸ ± ۰/۰۳ a B

در هر ستون، میانگین‌های با حروف متفاوت کوچک، در سطح پنج درصد آزمون LSD اختلاف معنی دار دارند.

در هر ردیف، میانگین‌های با حروف متفاوت بزرگ، در سطح پنج درصد آزمون LSD به صورت جداگانه برای هر مشخصه اختلاف معنی دار دارند.

بحث و نتیجه گیری

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ‌ها به خصوص قارچ موناسکوس پورپورئوس از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا مطالعات قبلی گزارش کرده‌اند تغییرات مورفولوژیکی یک مداخله کننده اصلی در رشد سلولی و تولید رنگدانه است (۲۴). گزارش شده است

تغییرات مورفولوژی میسلیم در قارچ‌های رشته‌ای از شاخص‌های مهم وضعیت متابولیسم طی تخمیر است (۱۹). در مطالعه دیکشیت و تالا پراگادا، همه جهش یافته‌های موناسکوس تغییراتی در مورفولوژی اسپور نشان دادند که به نوبه خود بر تولید متابولیت‌های ثانویه و عملکرد آنها تأثیر گذاشته بودند (۱۱). نتایج

حاصل از بررسی عوامل جهش‌زای شیمیایی اسید نیترو و سدیم‌آزید بر ویژگی‌های ظاهری پرگنه قارچ *موناسکوس پورپورئوس* در این مطالعه نشان داد ویژگی‌های ظاهری پرگنه‌های انتخاب‌شده که در معرض عوامل شیمیایی بودند، نسبت به سویه وحشی تغییر کرده‌اند. براساس نتایج به‌دست آمده مشاهده شد قطر پرگنه در تمامی سویه‌های انتخاب‌شده نسبت به سویه وحشی کاهش یافته است. به نظر می‌رسد عوامل جهش‌زا باعث کاهش اندازه قطر پرگنه می‌شوند؛ زیرا در مطالعه یانگ‌اسمیت و همکاران^۱ جهش‌های قرمز و زرد *موناسکوس* اندازه پرگنه کوچک‌تری نسبت به سویه وحشی داشتند (۱۲). در مطالعه مالا و همکاران^۲ نیز که از تیمار ماوراءبنفش بر قارچ *آسپرژیلوس نایجر* استفاده کردند، اندازه پرگنه در سویه‌های جهش‌یافته کاهش یافت (۲۵). همچنین در مطالعه جاستین و همکاران^۳ که از تیمار اسید نیترو بر *آسپرژیلوس نایجر* استفاده کردند، بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد سویه‌های جهش‌یافته در مقایسه با سویه وحشی پرگنه‌های کوچک‌تری داشتند و این پرگنه‌ها فقط با ذره‌بین متمایز می‌شدند (۲۶). کمترین میزان قطر مشاهده‌شده متعلق به تیمار NA3 بود که بیشترین تغییر ظاهری را نسبت به سویه وحشی داشت. اندازه و شکل پرگنه‌های قارچ‌های رشته‌ای از فاکتورهای مهم برای شناسایی قارچ‌اند. تقسیم هسته‌ای و انشعابات میسلیم‌ی قارچ *موناسکوس پورپورئوس* وحشی تقریباً یک پرگنه مدور ایجاد می‌کند که در آن قطر با سرعت یکنواختی افزایش می‌یابد (۲۷). افزایش اندازه قطر پرگنه در سویه وحشی در روزهای بررسی‌شده روند یکنواختی داشت؛ در حالی که در بیشتر سویه‌های در معرض عوامل شیمیایی، حداکثر افزایش قطر پرگنه در روز سوم تا چهارم دیده شد و پس از آن، سرعت افزایش

قطر پرگنه خیلی آهسته بود و گاهی ثابت می‌ماند. رنگ سطح پرگنه تمامی تیمارها نسبت به سویه وحشی تیره‌تر بود و با افزایش زمان این رنگ تیره‌تر شد. رنگ پشت پرگنه‌های انتخاب‌شده قرمز تیره بود، در حالی که در سویه وحشی نارنجی روشن بود. در مطالعه‌ای که قارچ *موناسکوس* در معرض جهش‌زایی قرار گرفته بود، پرگنه‌های سویه مادری سفید و نارنجی بودند؛ در حالی که رنگ پرگنه‌های سویه جهش‌یافته تیره‌تر و نارنجی و قرمز بود (۲۸)؛ این نتایج با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت داشتند. در مطالعه حاضر هاله پرگنه در سویه وحشی سفید و پهن بود؛ در حالی که در بقیه سویه‌ها هاله باریک‌تر و رنگی بود. میسلیم در سویه وحشی از تمامی تیمارها، بلندتر و سفید رنگ بود؛ اما در بقیه تیمارها میسلیم‌ها کوتاه‌تر و سفید و رنگی بود. در مطالعه سو و همکاران^۴ *موناسکوس پورپورئوس* سویه وحشی میسلیم بلند و سفید بود و میسلیم سویه‌های جهش‌یافته کوتاه و سفید و قرمز بودند (۲۸). همچنین در مطالعه دیگری، میسلیم‌های *موناسکوس پورپورئوس* سویه وحشی و وحشی بلند بود؛ اما جهش‌های سفید، زرد و قرمز میسلیم‌های کوتاهی داشتند (۱۴). نتایج دو مطالعه اخیر امکان ایجاد جهش در مطالعه حاضر را تأیید می‌کند. در پژوهش حاضر سطح پرگنه در سویه وحشی، صاف و فقط در مرکز برآمده بود؛ در حالی که بیشتر سویه‌های تیمار شده سطح پرگنه‌شان کاملاً صاف یا کاملاً برآمده بود. تیمار NA2 که بیشترین رنگدانه را تولید کرده بود، سطح پرگنه صافی داشت. در مطالعه سو و همکاران^۴ پرگنه جهش‌یافته *موناسکوس پورپورئوس* مسطح بود و به نظر می‌رسید رنگدانه قرمز بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کرده است (۲۸).

براساس شکل ۱، ۲ و ۳، ویژگی‌های میکروسکوپی

میسلیوم، به بازدهی رنگدانه‌ای پایدار و بالا در تخمیر منجر می‌شود (۱۹). تولید مثل جنسی و غیر جنسی توسط سویه‌های انتخاب شده، در پژوهش حاضر مشاهده شد. طی ۷ روز زمان گرمخانه‌گذاری تیمار NA1 آسک تولید کرده بود که آسک محصول تولید مثل جنسی است. بقیه تیمارها هیچ کدام آسک تولید نکردند و عوامل شیمیایی اسید نیترو بر تولید مثل موناسکوس تأثیر گذاشته بود؛ زیرا موناسکوس پورپورئوس گونه‌ای از جنس موناسکوس است که به‌طور کلی تولید مثل غیر جنسی دارد، اگرچه اشکال کامل (اشکال تولید مثل جنسی) نیز یافت شده‌اند (۲۷). در پژوهش دیگری تصویر میکروسکوپی تیمارهای موناسکوس که در معرض عوامل جهش‌زا قرار گرفتند، چرخه زندگی غیر جنسی و جنسی را نشان دادند؛ آنهایی چرخه زندگی جنسی داشتند که رنگدانه بیشتری تولید کردند و ممکن است این دلیل بالاتر بودن رنگدانه جهش یافته‌ها نسبت به سویه وحشی باشد (۱۱). در حالی که در مطالعه لین و ایزو کاموناسکوس کوآلیانگ جهش یافته توانایی تشکیل آسکوسپور (تولید مثل جنسی) در محیط PDA را از دست داد و تمایل به تشکیل کینیدیوم (تولید مثل غیر جنسی) داشت و رشد نیز به شدت کاهش یافت (۳۱)؛ بنابراین، جهش در این پژوهش تأثیر منفی بر تولید رنگدانه گذاشته است.

نتایج نشان دادند نمونه‌های انتخاب شده طی مراحل تیمار سوسپانسیون اسپوری با اسید نیترو به‌طور معنی داری با نمونه وحشی اختلاف داشتند و ویژگی‌های رشد و تولید متابولیت‌های رنگدانه زرد، قرمز و نارنجی با نمونه وحشی متفاوت بودند. میزان تولید زیست توده در نمونه‌های انتخاب شده NA3 بیشتر از بقیه نمونه‌ها بود؛ اما در نسل اول اختلاف آماری معنی داری با نمونه

نمونه‌های انتخاب شده از تیمارهای مختلف قارچ موناسکوس پورپورئوس که در معرض اسید نیترو و سدیم آزید بودند، به شدت تغییر کردند. برخی تغییرات شامل ضخیم شدن، پیچ خوردگی، تورم میسلیومی، تولید کلامیدوسپور کینیدیایی و تغییراتی در تعداد دیواره‌های عرضی در نمای میکروسکوپی مشاهده شدند. دیواره عرضی در تیمارهای NA1، NA2، NA4 و NA6 مشاهده شد و دیواره عرضی در تیمار NA4 قطعه قطعه شده بود. در بیشتر تیمارها کلامیدوسپور کینیدیایی مشاهده شد، اما کلامیدوسپور کینیدیایی در سویه وحشی دیده نشد؛ زیرا در موارد خیلی نادر کلامیدوسپور کینیدیایی تشکیل می‌شود (۲۹). در تیمار NA1 میسلیوم‌ها به شدت پیچ خوردگی داشتند و در تیمار NA3 شدت پیچ خوردگی کمتر بود.

بیشتر سویه‌های انتخاب شده از لحاظ مورفولوژیکی و قطر میسلیوم نزدیک به هم بودند. قطر میسلیوم سویه‌های انتخاب شده در مقایسه با سویه وحشی افزایش یافته بود؛ به طوری که در تیمار SA1 بیشترین افزایش قطر ملاحظه شد (شکل ۳) و قطر میسلیوم بیش از ۵۰ میکرومتر بود. در مطالعه سانتیگو و همکاران^{۳۲} که از عوامل جهش‌زا برای جهش‌زایی بر آسپرژیلوس نایجر استفاده کردند، طول و قطر میسلیوم در سویه‌های جهش یافته به‌طور معنی داری نسبت به سویه وحشی تغییر کرده و افزایش یافته بودند (۳۰). تجمع رنگدانه‌های موناسکوس با مورفولوژی میسلیوم به‌ویژه قطر میسلیوم ارتباط زیادی دارد. تغییرات در قطر میسلیوم ممکن است نتیجه تجمع توده داخل سلولی باشند و می‌توانند به عنوان شاخصی برای کنترل بیوستنز و ترشح رنگدانه‌ها در تخمیر استفاده شوند. بیوستنز رنگدانه را با تنظیم قطر میسلیوم می‌توان کنترل کرد. حفظ مورفولوژی مناسب

را نشان داد؛ در نتیجه، با عوامل شیمیایی جهش‌زا به سویه‌هایی می‌توان دست یافت که به‌طور معنی‌داری تا چند برابر رنگدانه بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید می‌کنند و این سویه‌ها می‌توانند پایدار باشند. به‌کارگیری اسید نیترو و به‌عنوان تیمار شیمیایی جهش‌زا، بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و تولید رنگدانه قارچ *موناسکوس* می‌تواند تأثیرگذار باشد که احتمالاً به‌دلیل ایجاد جهش در ساختار ژنتیکی این قارچ است.

References

- (1) Grimm LH, Kelly S, Krull R, Hempel DC. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005; 69 (4): 375-84.
- (2) Chen W, He Y, Zhou Y, Shao Y, Feng Y, Li M, et al. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2015; 14 (5): 555-567.
- (3) Kang B, Zhang X, Wuc Zh, Qi H, Wanga Zh. Effect of pH and nonionic surfactant on profile of intracellular and extracellular *Monascus* pigments. *Process Biochemistry*. 2013; 48 (5-6): 759-767.
- (4) Juzlova P, Martinkova L, Kren V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996; 16 (3): 163-170.
- (5) Mapari SA, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of Water-Soluble Pigments as Potential Natural Food Colorants. *Current Opinion in Biotechnology*. 2005; 16 (2): 231-238.
- (6) Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012; 96 (6): 1421-1440.

وحشی و نمونه SA3 نداشت ($P < 0/05$). بیشتر سویه‌های تیمار شده به‌طور معنی‌داری رنگدانه بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند ($P < 0/05$). میزان تولید رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز در نمونه‌های انتخاب‌شده NA2، NA3 و NA6 به‌طور معنی‌داری بیشتر از نمونه وحشی بود ($P < 0/05$). در مطالعه دیکشیت و تالاپراگادا نیز سویه‌های *موناسکوس* جهش‌یافته دو برابر رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز بیشتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند (۱۱). در پژوهش یانگ‌اسمیت و همکاران نیز پس از اندازه‌گیری رنگدانه مشخص شد جهش بیشترین تأثیر را بر افزایش تولید رنگدانه گونه‌های *موناسکوس* داشته است (۱۴). در مطالعه حاضر پس از بررسی‌های انجام‌شده بر تولید رنگدانه و زیست‌توده مشخص شد به‌جز سویه وحشی اختلاف آماری معنی‌داری در نمونه‌های NA2، NA3 و NA6 در میزان زیست‌توده و رنگدانه زرد، نارنجی و قرمز طی دو نسل وجود ندارد و نشان‌دهنده پایداری این نمونه‌ها طی دو نسل متوالی است. در مطالعات قبلی نیز مشخصه رشد *موناسکوس* جهش‌یافته پایدار بوده است (۳۲). در پژوهش وانگ‌سورن و همکاران نبات *موناسکوس پورپورئوس* جهش‌یافته نسبت به حلال‌های مختلف در سویه وحشی و تمام نسل‌های جهش‌یافته مشاهده شد (۳۳). در مطالعات دیگر که از عوامل جهش‌زا برای جهش‌زایی دیگر میکروارگانیسم‌ها استفاده شده بود، سویه‌های جهش‌یافته تا چند نسل پایدار بودند؛ برای مثال، در مطالعه‌ای که از جهش‌زایی آسپرژیلوس ترئوس برای افزایش تولید لوواستاتین استفاده شد، بازده تولید لوواستاتین در جهش‌یافته‌ها تا ۹ نسل پایدار بود (۳۴). نتایج پژوهش حاضر تأثیرگذاری عوامل شیمیایی جهش‌زا بر قارچ *موناسکوس پورپورئوس*

- (7) Lv J, Zhang BB, Liu XD, Zhang Ch, Chen L, Xu JR, et al. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2017; 124 (4): 452-458.
- (8) Ajdari Z, Ebrahimpour A, Abdul Manan M, Muhajir H, Rosfarizan M, Arbakariya BA. Nutritional requirements for the improvement of growth and sporulation of several strains of *Monascus purpureus* on Solid State Cultivation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2011; 2011: 487329.
- (9) Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkho A, Leksawasdi N. Review of Angkak Production *Monascus purpureus*. *Chiang Mai Journal of Science*. 2007; 34 (3): 319-328.
- (10) Radha S, Babu RS, Sridevi A, Prasad BL, Narasimha G. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*. 2012; 2 (5): 1517-1528.
- (11) Dikshit R, Tallapragada P. Development and screening of mutants from *Monascus sanguineus* for secondary metabolites production. *Journal of Basic and Applied Sciences*. 2018; 7 (2): 235-240.
- (12) Yongsmith B, Kitprechavanich V, Chitradon L, Chaisrisook Ch, Budda N. Color mutants of *Monascus* sp. KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2000; 10 (1-3): 263-272.
- (13) Keivani H, Jahadi M, Ghasemisepero N. Optimizing submerged cultivation for the production of red pigments by *Monascus purpureus* on soybean meals using response surface methodology. *Applied Food Biotechnology*. 2020; 7 (3): 143-152.
- (14) Babitha S, Soccol CR, Pandey A. Effect of stress on growth, pigment production and morphology of *Monascus* sp. in solid cultures. *Journal of Basic Microbiology*. 2007; 47 (2): 118-126.
- (15) Wolk DM, Johnson CH, Rice EW, Marshall MM, Grahn KF, Plummer CB, et al. A spore counting method and cell culture model for chlorine disinfection studies of encephalitozoon syn. *Septata intestinalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66 (4): 1266-1273.
- (16) Gopinath KP, Murugesan Sh, Abraham J, Muthukumar K. Bacillus sp. Mutant for improved biodegradation of congo red: random mutagenesis approach. *Bioresource Technology*. 2009; 100 (24): 6295-6300.
- (17) Yolmeh M, Khomeiri M. Using physical and chemical mutagens for enhanced carotenoid production from *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5256). *Journal Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2016; 8: 158-166.
- (18) Zhou B, Tian Y, Zhong H. Application of a two-stage agitation speed control strategy to enhance yellow pigments production by *Monascus anka* mutant. *Journal Of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*. 2019; 8 (6): 1260-1264.
- (19) Chen G, Huang T, Bei Q, Tian X, Wu Z. Correlation of pigment production with mycelium morphology in extractive fermentation of *Monascus anka* GIM 3.592. *Process Biochemistry*. 2017; 58: 42-50.
- (20) Dikshit R, Tallapragada P. Comparative study of *Monascus sanguineus* and *Monascus purpureus* as potential sources for red pigment production. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012; 3 (4): 885-895.
- (21) Hamano PS, Kilikian BV. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2006; 23 (6): 443-449.
- (22) Ghribi D, Zouari N, Jaoua S. Improvement

- of bioinsecticides production through mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* by u.v. and nitrous acid affecting metabolic pathways and/or delta-endotoxin synthesis. *Journal of Applied Microbiology*. 2004; 97 (2): 338-346.
- (23) Agboyibor C, Kong WB, Chen D, Zhang AM, Niu SHQ. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018; 16: 433-447.
- (24) Kim D, Ku S. Beneficial effects of *Monascus* sp. KCCM 10093 pigments and derivatives: a mini review. *Molecules*. 2018; 23 (1): 98.
- (25) Mala JGS, Kamini NR, Puvanakrishnan R. Strain improvement of *Aspergillus niger* for enhanced lipase production. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2001; 47 (4): 181-186.
- (26) Justin K, Viateur U, Prudentienne M. Use of nitrous acid mutant of *Aspergillus niger* for citric acid production from local cane-molasses. *African Journal of Microbiology Research*. 2010; 4 (13): 1446-1452.
- (27) Musaabakri AM, Rosfarizan M, Arbakariya A. The morphology and structure of red pigment producing fungus: *Monascus purpureus*. *Journal of Microbiology & Experimentation*. 2017; 5 (1): 43106.
- (28) Suh SH, Rheem S, Mah JH, Lee W, Byun MW, Hwang HJ. Optimization of production of monacolin K from -irradiated *Monascus* Mutant by use of response surface methodology. *Journal of Medicinal Food*. 2007; 10 (3): 408-415.
- (29) Patakova P, Branska B, Patrovsky M. Fungal Metabolites In: Mérillon JM, Ramawat KG, editor. *Monascus Secondary Metabolites*. 1 th ed. Prague: Springer. 2017: 821-851.
- (30) Santiago SDN, González CR, Almendárez BG, Fernández FJ, Jurado AT, Ochoa SH. Physiological, morphological, and mannanase production studies on *Aspergillus niger* uam-gsl mutants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2006; 9 (1): 51-60.
- (31) Lin ChF, Iizuka H. Production of extracellular pigment by a mutant of *Monascus kaoliang* sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982; 43 (3): 671-676.
- (32) Srianta I, Ristiarini S, Sen SK, Zhang BB, Xu GR, Blanc P. Recent research and development of *Monascus* fermentation products. *International Food Research Journal*. 2014; 21 (1): 1-12.
- (33) Wongsorn H, Wongjebboot I, Kongruang S. Solvent stability of ultrasonic mutants of *Monascus purpureus* pigments. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 2011; 1 (3): 206-210.
- (34) Li ShW, Li M, Song HP, Feng JL, Tai XSh. Induction of a high-yield lovastatin mutant of *Aspergillus terreus* by 12C6+ heavy-ion beam irradiation and the influence of culture conditions on lovastatin production under submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011; 165 (3-4): 913-925.

¹ Ascomycetes² Ascomycota³ Monascaceae⁴ Dikshit and Tallapraga⁵ Potato dextrose agar (PDA)⁶ Yeast powder-Soluble starch⁷ Least Significant Difference (LSD)⁸ Yongsmith et al⁹ Mala et al¹⁰ Justin et al¹¹ Suh et al¹² Santiago et al¹³ Lin and Iizuka¹⁴ Wongsorn et al