مجله علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸ ، ص ۲۶-۱۸

Journal of Horticultural Sciences
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, P. 18-26

بررسی تاثیر ترکیب محیط کشت، pH و دما بر سرعت رشد و وزن میسلیوم قارچ "شی‌تاکه" در شرایط جامد و مایع

لیلا رازقی یدک[۱] - مجید عزیزی*[۲]- محمد فارسی[۳] - شادی شاه طهماسبی[۴]

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۲۴
تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵

چکیده

قارچ شی‌تاکه (*Lentinulus edodes*(Berk) Singer/Pegler) از لحاظ تولید مرتبه دوم را در میان قارچ‌های خوراکی مهم دنیا به خود اختصاص داده است. این قارچ به خاطر طعم و مزهٔ بی‌نظیر و همچنین خواص دارویی مدتهای مدیدی است که مورد توجه ویژه قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط محیطی برای تولید قارچ "شی‌تاکه" اجرا شد. در ابتدا اثر نوع محیط کشت (در چهار سطح)، pH (در سه سطح)، دما (در دو سطح) و تاثیر متقابل آنها بر رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت جامد بررسی شد. سپس تاثیر نوع محیط کشت و pH بر وزن میسلیوم در محیط کشت مایع و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرارگرفت. نوع طرح آماری در هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با ۴ تکرار بود. نتایج حاصله نشان داد که در محیط جامد اثر نوع محیط کشت، pH و دما بر سرعت رشد میسلیوم در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. اثر متقابل بین محیط کشت و pH ، دما و محیط کشت و pH و دما نیز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه سرعت رشد میسلیوم در محیط‌های کشت جامد نشان داد که بیشترین سرعت رشد (۸/۵۴ میلی‌متر در روز) در محیط‌های دست‌ساز ۱ و ۲ بدست آمد و کمترین سرعت رشد (۶/۲۰ میلی‌متر در روز) در محیط دست‌ساز۳ مشاهده شد. افزایش دما از ۲۵ به ۲۷ درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش معنی‌داری در سرعت رشد گردید. افزایش pH از ۴/۵ به ۶/۵ نیز منجر به کاهش رشد گردید و بیشترین سرعت رشد در pH =۴/۵ مشاهده شد. در محیط کشت مایع نیز تاثیر نوع محیط کشت و pH در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین وزن میسلیوم در محیط مایع متعلق به محیط‌های دست‌ساز بود و برعکس محیط کشت جامد، بهترین عملکرد میسلیوم در pH=۵/۵ بدست آمد.

واژه های کلیدی: شی‌تاکه، سرعت رشد میسلیوم، رشد رشته‌ای، وزن میسلیوم

مقدمه

قارچ "شی‌تاکه" (*Lentinulus edodes*(Berk) Singer/Pegler) از نظر تولید مرتبه دوم را در میان قارچ‌های خوراکی مهم دنیا به خود اختصاص داده است (پایگاه اطلاع رسانی انجمن بین المللی دانش قارچ‌های خوراکی)[۵]. این قارچ به نام های قارچ سیاه جنگلی یا نام چینی Shiang-gu نیز شهرت دارد و رایج‌ترین قارچ کشت شده در چین ، ژاپن و سایر کشورهای آسیایی است (۱۳ و۱۴).

این قارچ نه تنها یک غذای خوش‌طعم با بوی مطبوع است بلکه محتوی موادی است که دارای اثرات دارویی می‌باشند.خواص درمانی این قارچ شامل تقویت سیستم ایمنی بدن در مقابل امراض، کاهش میزان کلسترول خون و اثرات ضد ویروسی (مانند ویروس ایدز) و ضد سرطانی است. لنتینان[۶](پلی ساکارید جدا شده از این قارچ) یک ترکیب گوگردی دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد (۷).

میسلیوم این قارچ در ابتدا سفید رنگ بوده و سپس طویل شده و با تولید ریسه‌های هوایی، کلنی پنبه‌ای شکل ایجاد می‌کند و با گذشت زمان میسلیوم به رنگ قهوه‌ای شکلاتی در می‌آید (۲). فاکتورهای محیطی مهم موثر بر رشد میسلیوم قارچ "شی‌تاکه" شامل مواد غذایی (منابع کربن و نیتروژن)، pH محیط کشت و دمای

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* - نویسنده مسئول: Email: Azizi@um.ac.ir)
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضو گروه زیست فناوری قارچ های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد

5 - www.isms.biz

6 - Lentinan

Archive of SID
www.SID.ir

مناسب می‌باشند. غلظت اکسیژن و pH محیط کشت نیز فرآیندهای متابولیکی و در نتیجه توانایی آنها را برای استفاده از مواد غذایی بعنوان کربن، نیتروژن، ویتامین و مواد معدنی را تحت تاثیر قرار میدهد (۴).

رشد رشته‌ای قارچها بوسیلهٔ اندازه‌گیری رشد شعاعی هیفه‌های آنها با گذشت زمان روی محیط کشت‌های جامد تخمین زده می‌شود. سرعت رشد میسلیوم تحت شرایط متفاوت محیطی، متفاوت است (۴). بنابراین بررسی شرایط رشد مناسب برای رشد رشته‌ای قارچ از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳). طیف گسترده‌ای از محیط کشت‌ها برای قارچها استفاده می‌شوند. اغلب متخصصین اولویت را برای انتخاب محیط کشت براساس تجربه و ویژگی‌های گونهٔ قارچ قرار می‌دهند (۱۲). در شرایط آزمایشی، محیط‌های کشت جامد (آگار) مناسب می‌باشد، چون در حالت وحشی قارچها معمولاً از مواد جامد مثل چوب، پس مانده های بافت‌های گیاهی و حیوانی با خاک استفاده می‌کنند (۵) .

در تحقیقی مونتینی و همکاران اثر متقابل بین نژادهای *L.edodes* و محیط کشت‌های مختلف را با استفاده از بررسی چشمی دیجیتال به وسیله مشخص‌کردن حرکت و قدرت رشد میسلیوم در شرایط دقیق بررسی نمودند و دریافتند که سرعت رشد میسلیوم نژادهای "شی‌تاکه" در محیط کشت‌های غنی شده کمتر درحالی‌که قدرت رشد آنها در این محیط بیشتر بود (۱۰).

پروسر بهترین رشد میسلیوم‌ها (با اندازه‌گیری قطر شعاعی میسلیوم *L.edodes* روی محیط کشت‌های جامد) را در pH اندکی کمتر از ۵ گزارش نمود (۱۱).

پیرنیا در بررسی تاثیر دما و pH بر رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای، مناسب‌ترین pH را برای رشد میسلیوم این قارچ محدوده‌ی ۶/۵-۵/۵ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را مناسب‌ترین دما برای رشد میسلیوم در محیط‌کشت عصاره مالت آگار اعلام کرد (۱). بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که در ایران به غیر از تجارب فردی، تاکنون اقدامی در جهت پرورش و تولید تجاری این قارچ و گزارش علمی از نتایج بدست آمده منتشر نشده است.

در این بررسی به منظور تعیین شرایط محیطی بهینه‌ی رشد میسلیوم قارچ شی‌تاکه، در مرحله‌ی اول اثر محیط کشت، pH و دما و تاثیر متقابل آنها با اندازه گیری رشد شعاعی میسلیوم قارچ روی محیط کشت جامد بررسی شد و در مرحله‌ای دوم تاثیر محیط کشت و pH بر عملکرد میسلیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع بررسی گردید.

مواد و روش ها

کلیه آزمایش‌ها در آزمایشگاه گروه زیست فناوری قارچهای صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد انجام گرفت. نژاد قارچ CS-2 بود که از شرکت آمریکایی Mycomedia تهیه گردید.

محیط کشت جامد

برای مقایسه محیط کشت‌های MEA[1]،PDA[2] و CEA[3] یک آزمایش مقدماتی طراحی و اجرا شد و نتایج بدست آمده نشان داد که در بین این محیط کشت‌ها ،محیط کشت MEA از نظر سرعت رشد(۶/۸۱میلی‌متر در روز) وتراکم رشد نسبت به محیط‌های کشت دیگر برتری دارد. بنابراین محیط MEA به عنوان محیط پایه برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت و تیمارها شامل ترکیبات محیط کشت‌های مختلف (بر اساس وزن خشک) عصاره‌هایی از مواد زیر بود:

(۱)خاک اره ۱۰۰گرم، ملاس چغندرقند ۴۰گرم، سبوس گندم۲۰گرم، سبوس برنج۲۰گرم، کربنات کلسیم۴ گرم؛ (۲)خاک اره ۱۰۰ گرم ،سبوس‌گندم گرم ۲۰،سبوس برنج۲۰ گرم ،کربنات‌کلسیم ۴ گرم؛ (۳)خاک اره ۱۰۰ گرم.

مواد فوق در یک لیتر آب به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و سپس عصاره حاصل توسط پارچه‌ی ململ صاف گردید و سپس به هر کدام از عصاره‌های (۱) و (۲)، ۱۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار اضافه شد. عصاره (۳) به محیط کشت تجاری MEA اضافه گردید و محیط کشت MEA تجاری (۴) نیز برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. سپس pH هر کدام از محیط کشت‌ها در سه pH متفاوت ۴/۵ ، ۵/۵ و ۶/۵ تنظیم گردید. بعد از جامد شدن محیط‌های کشت، در زیر هود لامینار تمام پتری دیش‌ها با استفاده از پرگنه‌هایی با قطر مساوی ۵ میلیمتر تلقیح شدند و سپس ظروف به دو گروه تقسیم شدند، یک گروه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و گروه دوم در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در دو اتاقک رشد متفاوت قرار داده شدند. سپس به منظور اندازه‌گیری رشد شعاعی میسلیوم‌ها، بطور روزانه دو قطر عمود بر هم پرگنه روی پتری دیش با کولیس ورنیه اندازه‌گیری گردید .

محیط کشت مایع

در آزمایش دوم برای ارزیابی بیومس و تراکم میسلیوم قارچ مورد نظر از محیط کشت مایع استفاده شد، بدین منظور مراحل قبل (بدون آگار) دقیقا تکرار شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت در ویال‌هایی با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر توزیع گردید. پس از آن در زیر هود استریل پرگنه‌هایی با قطر مساوی ۵ میلی‌متر و با حداقل آگار به داخل ویال‌ها مایه کوبی و به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد آنکوبه گردید. پس از گذشت ۱۸ روز محتویات ویال خارج شده و به دقت میسلیوم‌ها از محیط کشت جدا گردید. سپس با قرار

1 - Malt Extract Agar
2- Potato Dextrose Agar
3- Compost Extract Agar

Archive of SID

www.SID.ir

دادن میسلیوم‌ها بر روی کاغذ صافی نسبت به حذف رطوبت باقیمانده اقدام شد. در نهایت وزن میسلیوم‌های تولید شده با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ تعیین گردید.

هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب کاملا تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. نتایج حاصله پس از ارزیابی و مقایسه آماری با نرم افزار MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تاثیر نوع محیط کشت بر رشد شعاعی میسلیوم

از آنجایی که تاثیر عوامل محیطی بیشتر در محیط جامد بررسی می‌شود، لذا در آزمایش اول تاثیر محیط کشت،pH و دماهای مختلف بر رشد میسلیوم شی‌تاکه در حالت جامد بررسی شد.

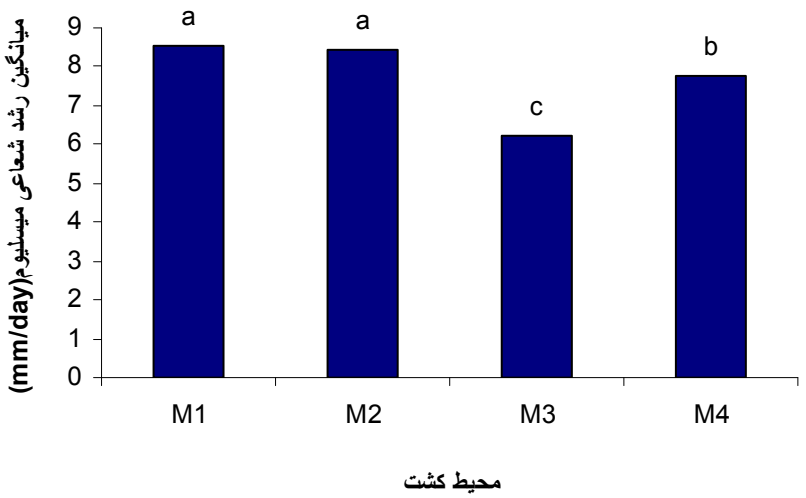
نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) و بررسی تاثیر نوع محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه نشان داد که نوع محیط کشت تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم دارد. مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در شکل۱ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین سرعت رشد ۸/۵۴ میلی‌متر بر روز در محیط کشت ۱ (M1) و کمترین سرعت رشد در محیط کشت دست‌ساز۳ (M3) با ۶/ ۲۰ میلی‌متر بر روز مشاهده شد و بین محیط کشت ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

جدول(۱)- تجزیه واریانس برای رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه در محیط کشت جامد

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۳	۲۷/۹۱۶**
pH	۲	۵/۱۳۳**
دما	۱	۷/۰۶۳**
محیط کشت×pH	۶	۱/۸۳۰**
محیط کشت × دما	۳	۰/۹۴۳**
pH × دما	۲	۰/۴۵۰**
pH × محیط کشت × دما	۶	۰/۱۰۶ns
خطا	۷۲	۰/۰۸۶
ضریب تغییرات (٪)		۳/۷۹

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱

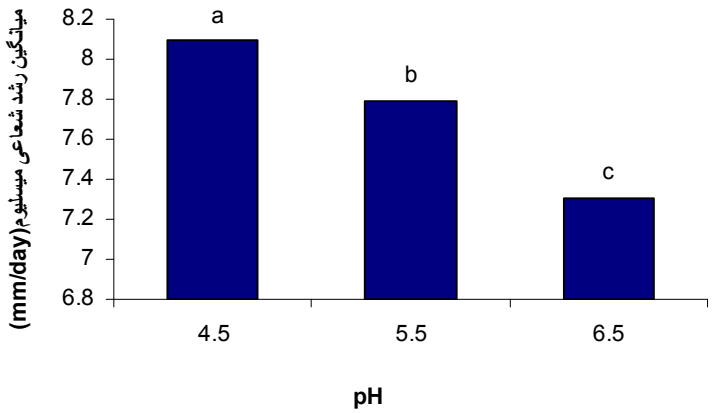
ns بی معنی در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵



شکل(۱)- تاثیر محیط کشت های مختلف بر رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی تاکه(M1: محیط کشت دست‌ساز۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز۲ محتوی خاک اره + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره+ محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل(۲)- تاثیر pH های مختلف بر رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه در محیط کشت جامد

تاثیر pH بر رشد شعاعی میسلیوم

نتایج آنالیز واریانس تاثیر pH محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه نشان می‌دهد که pH محیط کشت تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم دارد.

مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در شکل ۲ آمده است با افزایش pH از ۴/۵ به ۶/۵ سرعت رشد شعاعی میسلیوم کاهش معنی‌داری می‌یابد، به‌طوری‌که بیشترین سرعت رشد شعاعی برابر با ۸/۰۹ میلیمتر بر روز در pH= ۴/ ۵ و کمترین سرعت رشد شعاعی در pH= ۶/۵ با ۷/۳۰ میلی‌متر بر روز اتفاق افتاد. تریشو (۱۵) اپتیمم pH را برای رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای ۶/۸ ذکر نمود در حالیکه pH=۶ نیز به عنوان بهترین pH برای رشد میسلیوم قارچ خوراکی گزارش شده است (۲)، پیرنیا (۱) بهترین pH را برای رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای در محیط کشت جامد ۶/۵ بدست آورد.

اثر pH بر رشد قارچها نتیجه‌ی مجموعه اثراتی است که pH بر عوامل متعدد کنترل رشد اعمال می کند. بطوریکه رشد در pH پایین ممکن است در نتیجه‌ی افزایش دسترسی قارچها به یونهایی مثل آهن باشد در حالیکه رشد درpH بالا ممکن است مربوط به افزایش فعالیت‌های آنزیمی باشد. غلظت اکسیژن و pH محیط کشت از طریق تاثیر بر فرآیندهای متابولیکی قارچها و در نتیجه توانایی آنها برای استفاده از موادغذایی به‌عنوان کربن، نیتروژن، ویتامین و مواد معدنی رشد را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۸ و۶).

تاثیر دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم

نتایج آنالیز واریانس تاثیر دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه نشان می‌دهد که دما تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ ٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم داشته است. بیشترین سرعت رشد شعاعی ۸/۰۰ میلی‌متر بر روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد و کمترین سرعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد با ۷/۴۵ میلی‌متر بر روز مشاهده شد. با افزایش دما از ۲۵ به ۲۷ درجه سانتی‌گراد سرعت رشد میسلیوم کاهش می‌یابد.

تریشو(۱۵) اپتیمم دما را برای رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای در محیط این ویترو ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد اعلام کرد. پیرنیا (۱) دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را برای رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای بهینه اعلام کرد. هاس‌گاوا و همکاران (۶) با بررسی تاثیر دما بر رشد قارچ شی‌تاکه به این نتیجه رسیدند که دماهای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد میسلیوم را در محیط کشت مایع افزایش می‌دهند.

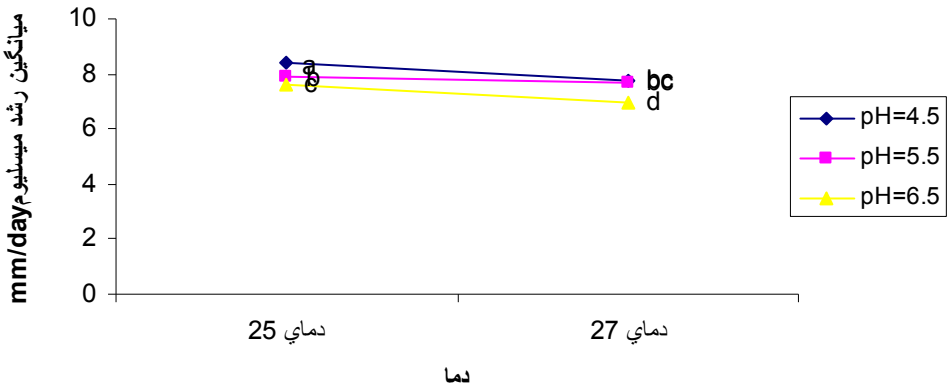
درجه حرارت منجر به افزایش سرعت فعالیت‌های متابولیکی می‌گردد. علاوه بر این سنتز ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه یا دیگر متابولیت‌ها نیز متاثر از درجه حرارت می‌باشد. به نظر می‌رسد که کاهش رشد قارچها در دماهای بالا مستقیما مربوط به عدم توانایی آنها در سنتز یک چنین مواد ضروری باشد.

اثر متقابل pH و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم

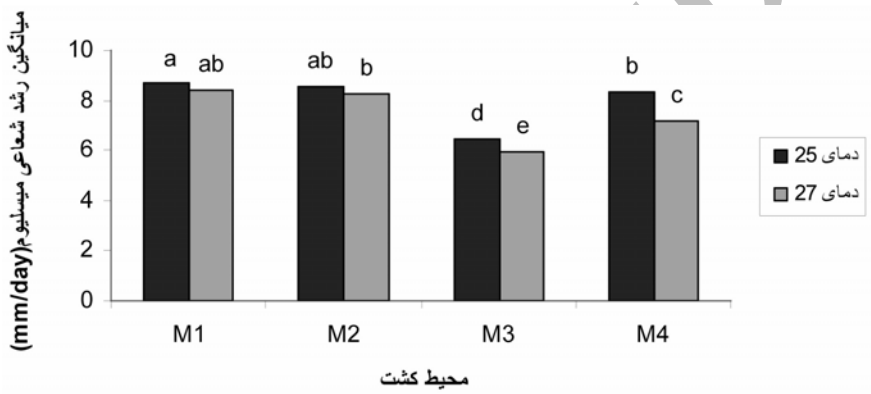
نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر متقابل دما و pH بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است .مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیوم حاصل از تیمارهای متقابل دما وpH در شکل ۳ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین رشد شعاعی در pH =۴/۵ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ، ۸/۴۳ میلی‌متر بر روز بوده که این نتیجه با نتیجه پروسر (۱۱) که بهترین رشد میسلیوم را در pH کمتر از ۵ اعلام کرده بود، مطابقت دارد. کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در pH=۶/۵ و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد (۶/۹۶) بود. با افزایش pH از ۴/۵ به ۶/۵ شاهد کاهش سرعت رشد در هر دو دما هستیم. در pH = ۵/۵ بین دماهای مختلف از این نظر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در حالیکه در pH های ۴/۵ و ۶/۵ این اختلاف در دماهای مختلف معنی‌دار بود و در هر pH سرعت رشد شعاعی میسلیوم در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد کمتر از دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است.

Archive of SID

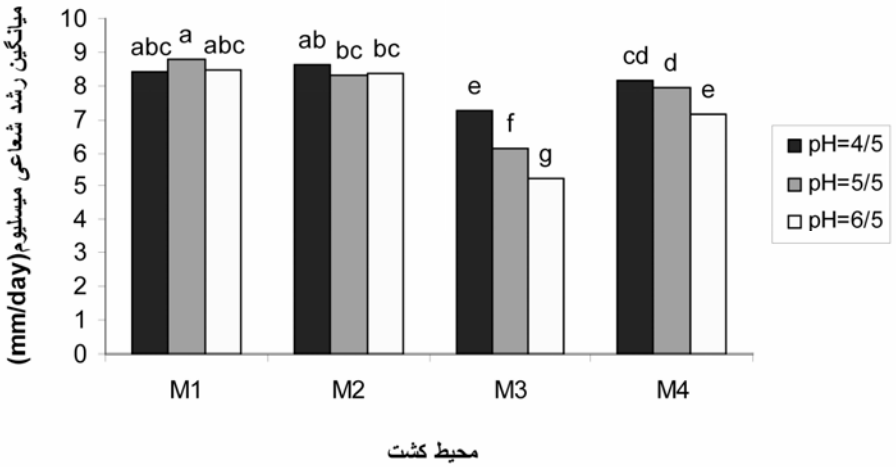
www.SID.ir



شکل(۳)- اثر متقابل pH و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد (حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.)



شکل(٤)- اثر متقابل محیط کشت و دما بر رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد (M1: محیط کشت دست‌ساز۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند+ سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز۲ محتوی خاک اره + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA) حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل(٥)- اثر متقابل pH و محیط کشت بر رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد(M1: محیط کشت دست‌ساز۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز۲ محتوی خاک اره + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

www.SID.ir

اثر متقابل محیط کشت و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم

اثر متقابل دما و محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه که در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود. بیشترین سرعت رشد شعاعی در محیط کشت ۱ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۸/۶۶ میلی‌متر بر روز بود و کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیوم درمحیط کشت ۳ و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد(۵/۹۵) مشاهده شد (شکل ۴).

در محیط کشت تجاری MEA (محیط کشت M4) و محیط کشت تجاری غنی شده با عصاره خاک‌اره (محیط کشت M3) اختلاف بین دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۲۷ درجه سانتی‌گراد معنی‌دار بود ولی در محیط کشت‌های دست‌ساز ۱ و۲ این اختلاف معنی‌دار نبود، اگرچه سرعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد کمتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود.

اثر متقابل محیط کشت و pH بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم

اثر متقابل pH و محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ شی‌تاکه نشان می‌دهد که در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شده است.بیشترین رشد شعاعی درمحیط کشت ۱ و pH= ۵/۵ و برابر ۸/۷۶ میلی‌متر بر روز بود و کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت ۳ و pH=۶/۵ برابر با ۵/۲۳ میلی‌متر بر روز مشاهده شد (شکل ۵).

همانطور که مشخص است تاثیر pH های مختلف در محیط کشت‌های دست‌ساز۱ و ۲ معنی‌دار نیست. همچنین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در هر دو محیط کشت مزبور در pH های مختلف بیشتر از دو محیط کشت دیگر (محیط کشت‌های ۳ و ۴) است.

از آنجایی که در محیط کشت جامد اندازه گیری قطر کلنی تنها در دو قطر علامت‌گذاری شده بر روی پتری دیش انجام می‌شود و میزان تراکم مورد توجه نیست و اینکه وزن میسلیوم معیار دقیق‌تری برای ارزیابی رشد است لذا نتایج در محیط کشت مایع هم بررسی شد.

نتایج تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت مایع و pH در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان می‌دهند که اثر نوع محیط کشت، pH های مختلف و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است.

تاثیر نوع محیط کشت بر وزن میسلیوم در محیط کشت مایع

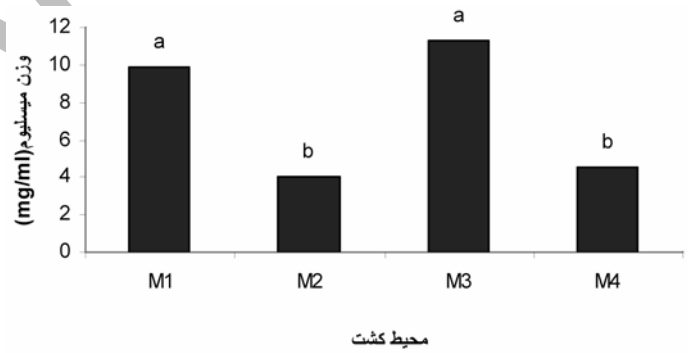
بیشترین وزن میسلیوم ۱۱/۳۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محیط کشت ۳ و کمترین وزن در محیط کشت ۲ برابر با ۴/۰۵۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد (شکل ۶) و بین محیط کشت ۱ و ۳ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. بنابراین بهترین محیط کشت برای تراکم میسلیوم، محیط کشت ۳ توصیه می‌گردد.

جدول(۲)- تجزیه واریانس وزن میسلیوم در آزمایش محیط کشت مایع

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۳	۰/۰۴۹*
pH	۲	۰/۰۱۰*
محیط کشت × pH	۶	۰/۰۰۱*
خطا	۲۴	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (٪)		۱۶/۰۰

نوع آزمون:چند دامنه‌ای دانکن

* معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵



شکل(٦)- اثر محیط کشت بر وزن میسلیوم قارچ شی‌تا که در محیط کشت مایع (M1: محیط کشت دست‌ساز۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز۲ محتوی خاک اره + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Archive of SID

www.SID.ir

مونتینی و همکاران (۱۵) اعلام کردند که سرعت رشد میسلیوم شی‌تاکه در محیط کشت‌های غنی شده کمتر است در حالیکه قدرت رشد در محیط‌های مذکور بیشتر است. آنها فاکتور محدودکننده برای رشد میسلیوم شی‌تاکه را نیتروژن عنوان کردند و دلیل کاهش سرعت رشد در محیط‌های غنی شده را وجود نیتروژن موجود در موادی مثل سبوس گندم و سبوس برنج دانستند در حالیکه این مواد قدرت رشد بیشتری را باعث شدند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با یافته‌های بخش دوم آنها مطابقت دارد بطوریکه بیشترین سرعت و وزن میسلیوم (قدرت) در محیط کشت‌های دست ساز۱ و۳ (غنی شده) به دست آمد که محیط کشت ۱ دارای عصاره سبوس‌گندم و برنج و محیط کشت ۳ حاوی MEA بود.

اثر pH بر تراکم (وزن) میسلیوم در محیط کشت مایع

نتایج آنالیز واریانس تاثیر pH محیط کشت بر وزن میسلیوم قارچ شی‌تاکه نشان می‌دهد که pH محیط کشت تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر وزن میسلیوم داشته است. بیشترین وزن میسلیوم (۸/۷۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر) محیط کشت در pH= ۵/ ۵ و کمترین وزن میسلیوم (۸۹/ ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در pH=۴/۵ مشاهده شد. با افزایش pH از ۴/۵ به ۵/۵ وزن میسلیوم افزایش معنی‌داری یافت ولی بین pH=۵/۵ و pH= ۶/۵ اختلاف معنی‌دار نبود. اگرچه با افزایش pH از ۵/۵ به ۶/۵ عملکرد میسلیوم کاهش یافت. بهترین pHبرای تراکم میسلیوم در محیط کشت مایع pH=۵/۵ بدست آمد.

هاس‌گاوا و همکاران(۶) pH بهینه برای رشد میسلیوم را در محیط کشت مایع ۳/۵-۳/۰ اعلام کردند.

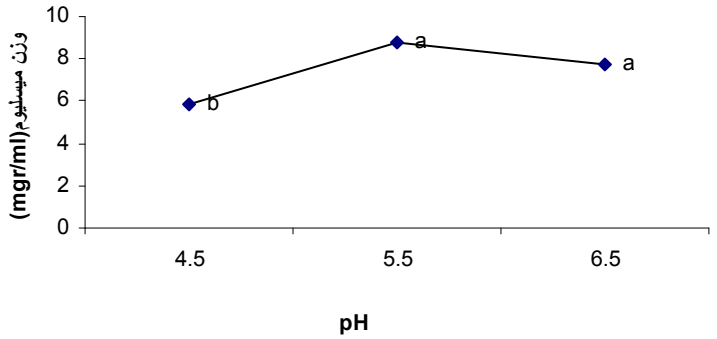
نتایج مربوط به pH در دو محیط کشت جامد و مایع متفاوت بود به‌طوری‌که در محیط کشت جامد pH بهینه ۴/۵ بود ولی در محیط کشت مایع بیشترین وزن میسلیوم در pH= ۵/۵ بدست آمد که دلیل این امر به نظر می‌رسد به علت سهولت دسترسی مواد در محیط کشت مایع نسبت به جامد باشد.

اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیوم در محیط کشت مایع

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می‌دهد که اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیوم قارچ شی‌تاکه در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی‌دار است. مقایسه میانگین وزن میسلیوم در شکل ۸ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین تراکم میسلیوم در محیط کشت ۳ و pH= ۵/۵ با ۱۳/۱۲۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کمترین آن در محیط کشت ۲ و pH= ۴/۵ با ۲/۲۸۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است به‌طوری‌که اختلاف بیشترین وزن و کمترین وزن برابر با ۱۰/۸۳۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. شکل ۸ نشان می‌دهد که محیط کشت‌های ۱ و ۳ در هر سه pH ، ۴/۵ ، ۵/۵ و ۶/۵ دارای وزن بیشتری بوده‌اند.

از آنجایی که سرعت رشد میسلیوم در محیط جامد سریعتر می‌باشد، بنابراین برای تولید اسپان و میوه قارچ شی‌تاکه محیط جامد به مایع برتری دارد.

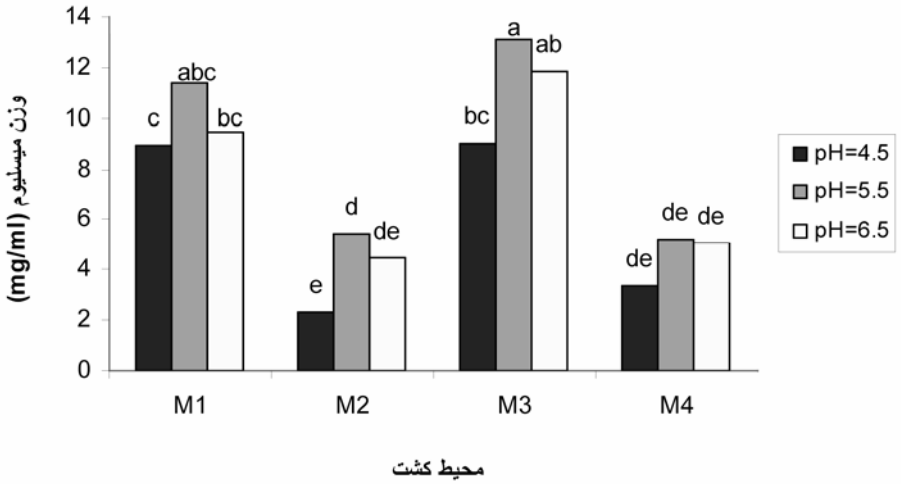
با توجه به کلیه نتایج بدست آمده می‌توان اظهار نمود که جهت تولید مواد موثره دارویی از این قارچ محیط کشت مایع به جامد ارجحیت دارد و به منظور بهینه‌سازی تولید مواد موثره در محیط کشت مایع نیاز به اجرای تحقیقات دیگر می‌باشد.



شکل(۷) - اثر pH بر تراکم(وزن) میسلیوم قارچ شی‌تا که در محیط کشت مایع(حروف یکسان دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ نمی باشند).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل(۸) - اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیوم قارچ شی تا که در محیط کشت مایع(M1: محیط کشت دست‌ساز۱ محتوی عصاره خاک اره+ملاس چغندر قند+سبوس گندم+سبوس برنج+کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز۲ محتوی خاک اره+سبوس گندم+سبوس برنج+کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره+ محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

منابع

۱- پیرنیا ن. ۱۳۷۸. مطالعه تاثیر pH ،دما و غلظت‌های مختلف هورمون 2-4-D بر رشد میسلیوم قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* ،پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه فردوسی مشهد،۸۵ص.

۲- محمدی گل تپه الف.، پورجم الف. ۱۳۸۲. اصول پرورش قارچ‌های خوراکی، دفتر نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس.

3- Aneja K.R. 2001. Experiment in microbiology plant pathology tissue culture and mushroom production technology, 568Pp

4- Chang S.T., Miles P.G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation Boca raton Florida, P. 189-223.

5- Griffin D.H. 1994. Growth, In: Fungal Physiology. 2. ed. Wiley - Liss, New York, P 458.

6- Hassegawa R.H, kasuya M.C.M., and vanetti M.C.D. 2005.growth and antibacterial activity of *lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes,Electronic journal of biotechnology ,vol.8 No.2

7- Hatvani N. 2001. Antibacterial effect of culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture, Elesevier, international journal of antimicrobial agents, 71-74.

8- Khan S.M., Mirza J.H., and Khan M.A. 1991. Studies on shiitake mushrooms (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler. XIII Internationa Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Dublin. P. 503-508.

9- Miller M.W, Joang S.C. 1987. Commercial cultivation of shiitake in sawdust filled plastic. In.wuest,P.J; Royse,D.J; Beelman,R.B(Eds), Developments in crop science,Vol.10, cultivation edible fungi. Elzevier, Amesterdam, pp.421-426.

10- Montini R.M.C, Passos J.R.S., and Eira A.F. 2006. Digital Monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler on agar medium, Brazilian Journal of Microbiology, 37: 90-95.

11- Prosser J.I. (1994). Kinetics of filamentous growth and branching. In: Gow, A. R., GADD, G. M. The growing fungus. Chapman & Hall, London, P. 301-335.

12- Royse D.J. and Sunchez-Vazquez J.E. 2000. influence of substrate wood chip particle size on shiitake (*lentinela edodes*) Yield. Bioresource technology, 76:229-233.

13- Shiomi H.F., Minhoni M.T.A., Machado J.O. and Filho A.C. 2007. Thermal and mechanical shocks affecting the first flush of production of *Lentinula edodes* on *Eucalyptus saligna* logs, Brazilian Journal of microbiology, 38: 200-203.

14- Smith J.E , Rowan N.J., and sulivan R. 2002. Medicinal mushroom.

15- Treshow C. 1944. Nutrition of cultivated mushroom,Dansk botanisk arkiv,Vol.11,180.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Horticultural Sciences
Vol. 23, No. 1, Spring-Summer 2009, P. 18-26

مجله علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۳، شماره ۱، نیمسال اول ۱۳۸۸ ، ص ۲۶-۱۸

Evaluation effect of media formulation, pH and temperature on" shiitake " mycelium growth analysis on solid and liquid culture conditions

L. Razeghi Yadak[1] – M. Azizi[2*] – M. Farsi[3] – Sh. Shahtahmasebi[4]

Abstract

Shiitake mushroom [*Lentinulus edodes*(Berk) Singer/Pegler] has the third production class among the most important edible mushrooms. For a long time this mushroom has draw attention due to its unique flavor and taste and also therapeutic properties. The research conducted to optimizing the environmental conditions for shiitake production. In the first experiment the effect of four medium types in solid form, three medium pH (4.5, 5.5 and 6.5) and two temperatures regimes (25 and 27 ^{o}C) were evaluated on mycelium radial growth of the mushroom. In second experiment the effect of medium types and pH was evaluated on mycelium yield in liquid form at 25 ^{o}C. The experimental design in both media was factorial on the basis of completely randomized design with 4 replications.The obtained results of the first experiment showed that medium type, pH and temperature significantly affect mycelium growth rate at $p\leq0.01$. Interaction between medium×pH, temperature×medium and pH×temperature also was significant at $p\leq0.01$. The highest growth rate (8.548mm/day) was detected on 1 and 2 "hand making" media and the lowest one (6.201mm/day) was observed on 3 hand making media. The higher temperature (27 ^{0}C) cause the lower the mycelium growth rate. Increasing the medium pH from 4.5 to 6.5 also decreased mycelium growth rate and the highest growth rate was observed at pH=4.5. In second experiment (liquid medium), medium type and pH also affect mycelium yield significantly ($p\leq0.05$). The highest mycelium yield was belong to hand making media and on the contrary with first experiment, the best mycelium yield was obtained on pH=5.5.

Key words: Shiitake, Mycelium growth rate, Mycelium filamentous growth, Mycelium yield

Archive of SID

1 - Msc student of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad
2- Associate Prof. of Medicinal Plants Production & Processing Departement of Horticulture, College of Agriculture , Ferdowsi University of Mashhad and member of research group of Industrial Fungi Biotechnology, Jihade Daneshgahi, Mashhad
(* - Corresponding author Email: Azizi @ um.ac.ir)
3- Professor of Biotechnology in Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad,
4- Member of Research Group of Industrial Fungi Biotechnology, Jihade Daneshgahi, Mashhad

www.SID.ir