بهینه سازی رشد و تولید زیست توده قارچ اندوفیت *Piriformospora indica*

هما نورا، صالح شهابی وند*، فرخ کریمی، احمد آقایی و فرشاد درویشی

مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۲۲

چکیده

قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* جذب مواد غذایی را در گیاهان افزایش داده، اجازه بقای گیاه تحت تنشهای زیستی و غیرزیستی را می‌دهد. این قارچ همچنین رشد و تولید بذر را تحریک می‌کند و سبب افزایش متابولیتهای ثانویه گیاهان دارویی می‌شود. مطالعات کمی در رابطه با کشت قارچهای همزیست وجود دارد لذا توسعه روش‌هایی که قادر به کشت انبوه قارچهای همزیست باشد، می‌تواند برای مطالعات عملی مناسب باشد. هدف این تحقیق تهیه محیط کشت ساده با بازده بالاتر جهت تولید زیست توده بیشتر برای این قارچ است. مقایسه دو محیط کشت ساده YPG (عصاره مخمر، پپتون، گلوکز) و پیچیده کافر بر اساس میزان وزن خشک قارچ صورت گرفت، سپس برای طراحی آزمایشات جهت بهینه سازی محیط از روش تاگوچی در بررسی تأثیر چهار عامل غلظت گلوکز، غلظت عصاره مخمر، غلظت پپتون و pH محیط بر روی غلظت زیست توده قارچ مورد نظر در یک کشت غیر مداوم استفاده شد. مقایسه منحنی رشد در دو محیط کافر و YPG نشان داد که قارچ *P. indica* در محیط YPG رشد بهتر و بیشتری دارد. پس از بهینه سازی محیط YPG میزان تولید زیست توده به ۱۹/۳ گرم در لیتر در مقایسه با میزان اولیه یعنی۱۶/۲ گرم در لیتر رسید. با توجه به تولید ۲/۵ برابری وزن خشک قارچ *P.indica* و همچنین ساخت مقرون به صرفه محیط کشت YPG نسبت به محیط کافر، می توان از محیط YPG به عنوان محیط کشت مناسب برای تولید انبوه این قارچ در کشاورزی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: بهینه سازی، زیست توده، *Piriformospora indica* ، محیط کشت YPG.

* نویسنده مسئول، تلفن ۰۹۱۴۱۲۰۱۸۱۱ ، پست الکترونیکی: shahabi70@yahoo.com

مقدمه

قارچ *P. indica* اندوفیت ریشه گیاهان خشکی‌زی از بیابان تار هند، توسط وارما و همکاران در سال ۱۹۹۹ جداسازی شده است (۱۷). در آن زمان کسی تصور نمی-کرد که این قارچ می‌تواند یکی از موجودات مدل در زمینه تحقیقات همزیستی باشد. برخلاف دیگر قارچهای میکوریزای اربوسکولار، *P. indica* می‌تواند به طور مجزا و بدون حضور ریشه گیاه میزبان رشد کند (۴). بررسیهای مولکولی برای تعیین موقعیت تاکسونومیکی براساس توالی 18s rRNA و مطالعات میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد که این قارچ بازیدیومیست و متعلق به خانواده جدید سباسیناسه است (۱۴). قارچ *P. indica* قادر به بهبود رشد و تولید زیست توده در گیاهان مختلف علفی و درختی است. این قارچ همچنین باعث افزایش مقاومت دربرابر فلزات سنگین، تنشهای دما و شوری، قارچهای بیماری‌زا و علف‌کشهای زیستی شده و تعدیل کننده سیستم ایمنی گیاه می‌باشد (۱۲). امروزه قارچ مذکور به عنوان کود زیستی و نیز به عنوان ابزاری برای تحقیقات پایه‌ای به کار می‌رود (۸). *P. indica* تولید متابولیتهای ثانویه گیاهان با ارزش اقتصادی را افزایش داده و همچنین سبب افزایش رشد و تولید بذر بسیاری از گیاهان می‌شود (۱۵). این اندوفیت قارچی، مقدار قابل توجهی اسید فسفاتاز برای تحرک طیف گسترده‌ای از اشکال غیرقابل

Archive of SID

www.SID.ir

حل یا پیچیده فسفات تولید می‌کند و گیاه میزبان را قادر می‌سازد تا دسترسی کافی به ذخایر فسفر کم‌تحرک در خاک داشته باشد (۱۱).

هیفهای *P. indica* اغلب به یکدیگر چسبیده و به شکل یک ریسمان درهم تنیده ساده دیده می‌شوند. میسلیوم‌های جوان‌تر سفید و اکثراً شفاف هستند. هیفها دارای دیواره نازکی به ابعاد ۰/۷ تا ۳/۵ میلی‌متر هستند (۶). دیواره هیفها آرایش منظمی از ترکیبات پلی ساکاریدی و پروتئینی را نشان می‌دهد که به شدت با رنگ تریپان بلو رنگ می‌گیرند. میسلیوم‌ها در هنگام بلوغ کلامیدیواسپورهای گلابی شکل اختصاصی تولید می‌کنند که به خاطر شکل خاص خود متمایز هستند. میانگین ضخامت اسپورها و دیواره هیفها به ترتیب ۷/ ۰ و ۰/۳ میکرومتر است (۱۳).

قارچ *P. indica* سیستم مدل مناسبی برای درک اساس مولکولی برهمکنش گیاه و میکروب ایجاد کرده است. کاربردهای آن در کشاورزی به عنوان کود زیستی و عامل کنترل زیستی با تلقیح ساده قارچ با استفاده از کشت تعلیقی (سوسپانسیون) میسر است (۱۵).

آماده سازی مایه تلقیح یکی از مشکلات اساسی استفاده از قارچهای همزیست می‌باشد زیرا عموماً این قارچها را نمی‌توان به طور مجزا از ریشه گیاهان و در شرایط آزمایشگاهی رشد داد (۱۶). این قارچ بر خلاف قارچهای میکوریز آربوسکولار می‌تواند به آسانی و به طور مجزا از گیاه میزبان، در محیطهای با ترکیبات حداقل و یا پیچیده رشد کند (۹). محیطهای بررسی شده برای این قارچ شامل محدوده گسترده ای از محیطهای سنتزی جامد و مایع است که در میان محیطهای آزمایش شده بهترین محیط کشت، کافر (۵) گزارش شده است. این محیط دارای عناصر ماکرو، میکرو، ویتامینها، عصاره مخمر، پپتون و گلوکز می‌باشد (۳) که به دلیل پیچیده بودن جهت استفاده در مقیاس صنعتی مناسب نمی‌باشد. امروزه استفاده از روشهای آماری جهت طراحی آزمایشات بسیار مرسوم است. استفاده از روشهایی مانند Response surface Methodology (RSM) و Plackett-Burman در طراحی آزمایشهای فرآیندهای زیستی متداول است. روش آماری کسری از فاکتوریل تاگوچی در مقایسه با سایر روشهای بهینه سازی نظیر فاکتوریل کامل و یک عامل در یک زمان نیاز به زمان کمتری دارد. بنابراین با صرف هزینه، وقت و تعداد آزمایشات کمتر می‌توان به شرایط بهینه تولید دست یافت. بهینه‌سازی محیط کشت یک ملاحظه اساسی در توسعه فرایند زیستی است که می‌تواند مایه تلقیح مناسب و مقرون به صرفه را در کشاورزی تولید کند.

با توجه به اهمیت قارچ *P. indica* و کاربردهای متفاوت این قارچ در همزیستی با ریشه گیاهان مختلف، هدف این تحقیق، بررسی و انتخاب یک محیط ساده، مناسب و ارزان قیمت برای کشت و تولید زیست توده بالاتر این قارچ است.

مواد و روشها

محیط‌های کشت و سویه قارچ: کشت اولیه قارچ *P. indica* (تهیه شده از پروفسور گل تپه، گروه بیماری-شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران) در پلیت حاوی محیط کافر با ۱۵ درصد آگار (Merck) انجام شد که ترکیبات این محیط کشت در جدولهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. جهت تلقیح به محیط کشت قطعه‌ایی به اندازه ۵ میلی متر از محیط جامد به همراه قارچ کشت داده شده به کمک پیپت پاستور استریل از محیط جامد جدا شد. پس از تلقیح محیط کشت جامد، پلیتها در انکوباتور با دمای ۱± ۲۹ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز قرار داده شدند.

جهت مقایسه منحنی رشد و تولید زیست توده از ارلن ۵۰ میلی لیتر حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت برای هر کدام از دو محیط کافر و YPG (جدول ۳) استفاده شد که به روش ذکر شده تلقیح گردیدند. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با

Archive of SID

www.SID.ir

دمای ۱±۲۹ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. ۳ ارلن در هر روز پس از تلقیح از انکوباتور برداشته شده و جهت اندازه‌گیری وزن خشک مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۱- مقادیر عناصر و ویتامینهای استفاده شده دراستوکهای محیط کافر.

ویتامین (g/100cc)		عناصر میکرو (g/100cc)		عناصر ماکرو (g/200cc)	
بیوتین	۰/۰۵	$ZnSO_4.7H_2O$	۲/۲	$NaNo_3$	۲۴
پیرودکسین	۰/۱	H_3Bo_3	۱/۱	Kcl	۲/۸
ریبوفلاوین	۰/۲۵	$MnCl_2.H_2o$	۰/۵	$MgSo_4$	۲/۸
		$FeSo_4$	۰/۵	KH_2Po_4	۶/۸
		$CoCl_2$	۰/۱۶		
		$CuSo_4$	۰/۱۶		
		$MoNH_4$	۰/۱۱		
		Na_2EDTA	۵		

جدول ۲- مقادیر مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کامل کافر.

ماده	مقدار
استوک ماکرو	۱۲/۵ml
استوک میکرو	۰/۶۲۵ ml
$CaCl_2$ (0.1M)	۰/۲۵ ml
استوک ویتامین	۰/۲۵ ml
گلوکز	۵ g
پپتون	۰/۷۵ g
عصاره مخمر	۰/۲۵ g

جدول ۳- مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تهیه محیط YPG.

ماده	g/L
عصاره مخمر	**۱۰**
پپتون	**۲۰**
گلوکز	**۲۰**

اندازگیری و بررسی رشد: رشد قارچ *P. indica* با روش اندازه گیری وزن خشک توده سلولی مورد بررسی قرار گرفت. پس از رشد قارچ محیط کشت به وسیله کاغذ صافی واتمن شماره ۴ جهت جداسازی توده سلولی از محیط کشت فیلتر شد، سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و وزن توده خشک اندازه گیری گردید. بازده زیست توده با استفاده از فرمول (۱) محاسبه گردید (۱۸) :

$$Yx/s = \frac{\text{گرم سوبسترا مصرف شده}}{\text{گرم زیست توده تولید شده}}$$

همچنین سرعت رشد ویژه (μ) از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۸):

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t}$$

که X_1 غلظت زیست توده اولیه و X_2 غلظت زیست توده ثانویه بر حسب گرم در لیتر، زمان t_0 عبارتست از زمان اولیه و t زمان ثانویه بر حسب ساعت می‌باشد.

بهینه سازی محیط کشت با طراحی آزمایش به روش تاگوچی: در روش تاگوچی ابتدا عوامل و سطوح مورد نظر تعیین می‌شود و سپس با استفاده از نرم افزار، جدول آرایه‌های متعامد طراحی می‌گردد. جهت بهینه‌سازی محیط YPG به روش تاگوچی از نرم‌افزار Qualitek-4® (شرکت Nutek Inc. آمریکا) استفاده شد. در روش تاگوچی از ابزار قدرتمند تحلیل واریانس (ANOVA) برای تحلیل نتایج استفاده می‌شود. رسم نمودارها به وسیله Microsoft Excel انجام گرفت و نتایج آنالیزهای آماری با مقدار P کوچکتر

Archive of SID

www.SID.ir

از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. عوامل اصلی مورد بررسی در این تحقیق گلوکز، پپتون، عصاره مخمر و pH در چهار سطح (جدول ۴) بودند که با استفاده از آرایه متعامد L-16 شانزده تیمار مختلف طراحی و به اجرا درآمد.

بر اساس جدول ۵ در ارلنهای ۵۰ میلی لیتری ۱۰ میلی لیتر از هر ۱۶ محیط با سه تکرار، تهیه و اتوکلاو شد. به هر یک از ارلنها، با استفاده از پیپت پاستور استریل از محیط کشت جامد قارچ قطعه‌ایی به اندازه ۵ میلی متر از قارچ به همراه محیط جامد در شرایط استریل، تلقیح شد. بلافاصله پس از تلقیح، یک تکرار از هر نمونه برداشته و به عنوان نمونه اولیه جهت اندازه‌گیری وزن خشک به کمک کاغذ صافی واتمن شماره ۴ فیلتر شد. سپس در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و وزن توده خشک اندازه گیری گردید. سایر نمونه‌ها به مدت ۷ روز در انکوباتور شیکردار با دمای ۱±۲۹ درجه سانتی گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

نتایج

با مقایسه میزان رشد قارچ *P. indica* در دو محیط کافر و YPG، بیشترین میزان رشد در محیط YPG مشاهده شد (شکل ۱). حداکثر رشد در محیط YPG هفت روز پس از کشت بود، اما در محیط کافر در روز پنجم به دست آمد (شکل ۲).

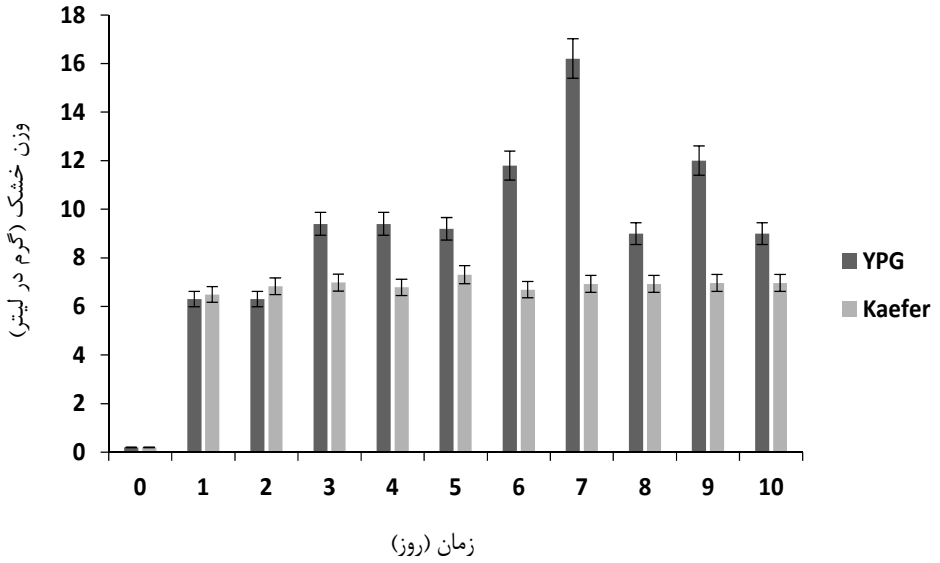
جدول ۴- عوامل اصلی (عصاره مخمر، پپتون، گلوکز و pH) و سطوح آنها

عوامل	سطح ۱	سطح ۲	سطح ۳	سطح ۴
گلوکز	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
پپتون	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰
عصاره مخمر	۵	۱۰	۱۵	۲۰
pH	۴	۵	۶	۷

بیشترین میزان رشد در محیط YPG حدود ۱۶ گرم در لیتر مشاهده شد که نسبت به محیط کافر بیش از دو برابر است. همچنین در سایر مطالعات بیشترین میزان رشد در محیط کافر ۷ گرم در لیتر در بیوراکتور ۱۴ لیتری گزارش شده است (۶ و ۱۴). همان طور که جدول ۶ نشان می‌دهد بازده زیست توده و سرعت رشد ویژه در محیط کشت YPG به طور معنی‌داری به مراتب بهتر از محیط کشت کافر است.

شکل۱- مقایسه میزان رشد قارچ *P. indica* در محیطهای کشت کافر (ارلن سمت راست) و YPG (ارلن سمت چپ)

www.SID.ir



شکل ۲- میزان رشد قارچ *P. indica* در دو محیط کشت YPG و کافر

جدول ۵- آرایه‌های متعامد برای سطوح مختلف عوامل اصلی گلوکز، پپتون، عصاره مخمر و pH

شماره آزمایش	گلوکز	پپتون	عصاره مخمر	pH
۱	۱	۱	۱	۱
۲	۱	۲	۲	۲
۳	۱	۳	۳	۳
۴	۱	۴	۴	۴
۵	۲	۱	۲	۳
۶	۲	۲	۱	۴
۷	۲	۳	۴	۱
۸	۲	۴	۳	۲
۹	۳	۱	۳	۴
۱۰	۳	۲	۴	۳
۱۱	۳	۳	۱	۲
۱۲	۳	۴	۲	۱
۱۳	۴	۱	۴	۲
۱۴	۴	۲	۳	۱
۱۵	۴	۳	۲	۴
۱۶	۴	۴	۱	۳

در ادامه بهینه سازی میزان تولید زیست توده قارچ *P. indica* در محیط کشت YPG با روش تاگوچی صورت گرفت. شکل (۳) میزان زیست توده قارچ پس از ۷ روز در هریک از آرایه ها را برحسب گرم در لیتر نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده جهت تجزیه وتحلیل استاندارد به نرم افزار Qualitek-4 وارد شد و اثر سطوح مختلف بر تولید زیست توده قارچ بررسی شد.

با تجزیه و تحلیلهای نرم افزار مشخص شد که در سطح سه، عوامل گلوکز، پپتون و عصاره مخمر دارای تفاوت معنی داری در افزایش رشد بوده اما افزایش سطح آنها باعث کم شدن رشد می‌شود. در مورد عامل pH سطح سوم و چهارم تقریباً اثر برابری بر رشد دارند و تفاوت معنی-داری نشان ندادند و سطح یک و دو سبب کاهش رشد قارچ شدند (شکل۴). نرم افزار Qualitek-4 قادر به محاسبه اثر متقابل عوامل مختلف به صورت دو به دو می باشد و برهمکنش بین عصاره مخمر و pH دارای بیشترین اهمیت است. در ادامه، برای بررسی بهتر و مشخص کردن بیشترین تأثیر عوامل اصلی بر روی تولید زیست توده، تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار انجام شد. همان طور که جدول ۷ نشان می‌دهد مهم ترین شاخص تأثیرگذار بر تولید زیست توده، pH در حدود ۵۳ درصد است که باعث ایجاد تفاوت معنی‌داری در رشد گردید و پس از آن عصاره مخمر، ترپیتون و pH به ترتیب در حدود ۱۷، ۱۳ و ۴ درصد هستند.

Archive of SID

www.SID.ir

میزان تولید پس از بهینه سازی محیط YPG ۱۹/۳ گرم در لیتر بوده است که نسبت به میزان اولیه یعنی۱۶/۲ گرم در لیتر به میزان ۱۶ درصد افزایش یافته است و تفاوت معنی-داری نشان داد. همچنین بهترین محیط آرایه شماره ۹ با سطوح گلوکز ۲۵ گرم بر لیتر، پپتون ۱۵ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۱۵ گرم بر لیتر و pH برابر ۷ به دست آمد.

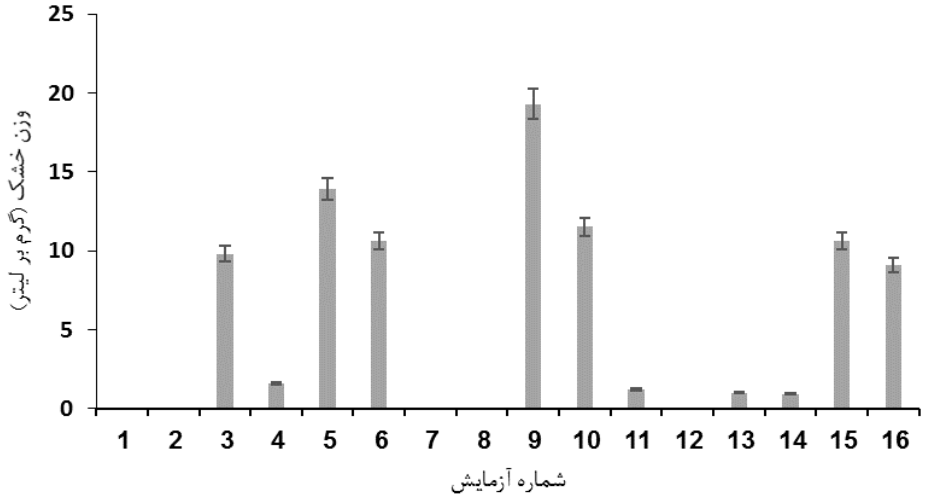
بحث

در زیست‌فناوری از روشهای آماری برای طراحی آزمایش و به تبع آن بهینه سازی استفاده می‌شود که باعث بهبود همزمان بسیاری از عوامل می‌شود. بهینه سازی به روش تاگوچی خطای آزمایش را تا حد زیادی کاهش داده و کارآیی و تکرار پذیری آزمایشات را افزایش می‌دهد (۱). محیطهای بررسی شده برای این قارچ شامل محدوده گسترده‌ای از محیط های سنتزی جامد و مایع مانند کافر، MS (Murashige and Skoog)، WPM (Woody Plant Medium)، محیط حداقل MMN (Modified Melin-Norkrans)، محیط موستر بی (Moser B)، عصاره مخمر-مالت (Malt–Yeast Extract)، سیب زمینی- دکستروز-آگار (Potato Dextrose Agar (PDA)) و آسپرژیلوس (*Aspergillus*) است که در میان محیط‌های آزمایش شده بهترین محیط کشت، کافر گزارش شده است.

طبق مطالعات پیشین یک کشت معمولی بر محیط جامد کافر بعد از ۷ روز رشد منظمی را نشان می دهد. میسلیوم ها بعد از ۲۸-۲۴ ساعت جوانه می‌زنند، سپس رشد متوقف خواهد شد و اسپورها تولید می‌شوند. محدوده دمایی رشد قارچ ۳۵-۲۵ درجه سانتیگراد است. برخلاف محیط آسپرژیلوس محیط در حال هم زدن MMN مایع، مانع رشد می‌شود (۱۰). قارچ طی ۵ روز رشد تا حدود ۴/۴ محیط را اسیدی می‌کند.

جدول ۶- مقایسه تأثیر دو محیط کشت YPG و کافر بر ویژگیهای رشد قارچ *P. indica*

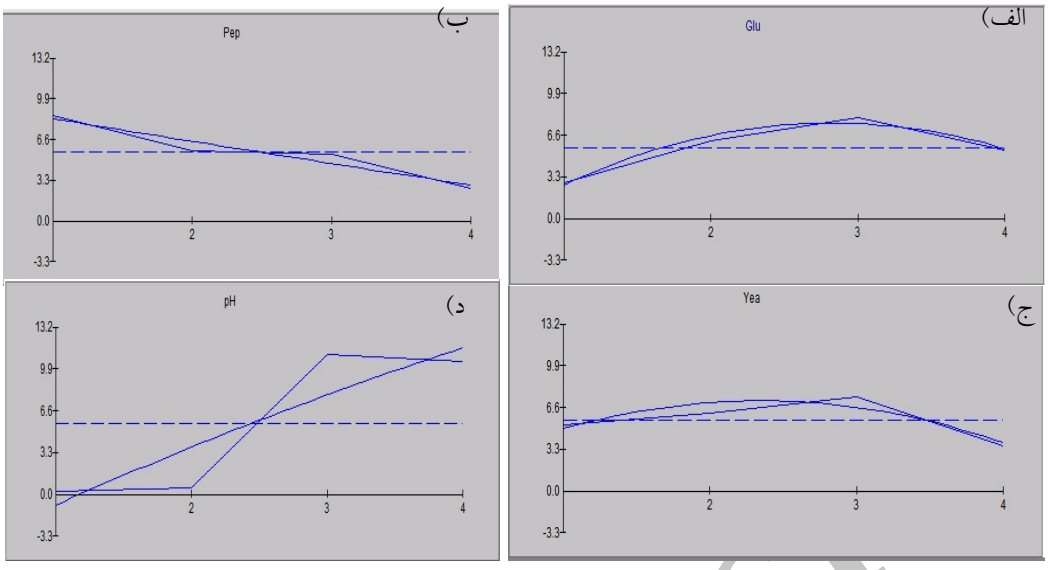
محیط کشت	حداکثر وزن خشک (g/L)	بازده زیست توده $Y_{x/s}$ (g/g)	سرعت رشد ویژه μ (d^{-1})	زمان مورد نیاز برای رسیدن به حداکثر رشد (روز)
کافر	۷/۳۱	۰/۱۸۳	۰/۰۳۰	۵
YPD	۱۶/۲	۰/۶۰۲	۰/۰۰۵۷	۷



شکل۳- نتایج میزان تولید زیست توده قارچ *P. indica* برای ۱۶ آرایه روش تاگوچی پس از ۷ روز

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- تأثیر سطوح عوامل اصلی بر روی متوسط تولید زیست توده قارچ *P. indica* الف)گلوکز ب)پپتون ج)عصاره مخمر د)pH. خطوط منقطع نشانگر متوسط نتایج تولید زیست توده در آزمایشات مختلف است.

جدول ۷- تجزیه و تحلیل آماری عوامل اصلی مؤثر بر روی تولید زیست توده قارچ

عامل	DOF (f)	Sum of Sqrs. (S)	Variance (V)	F-Ratio (F)	Pure Sum (S'')	Perecent P (%)
گلوکز	۳	۵۴/۵۵۱	۱۸/۱۸۳	۳/۶۲۹	۳۹/۵۲	۶/۵۱۴
پپتون	۳	۶۹/۲۸۱	۲۳/۰۹۳	۴/۶۰۸	۵۴/۲۴۹	۸/۹۴۱
عصاره مخمر	۳	۳۳/۳۲۹	۱۱/۱۰۸	۲/۲۱۷	۱۸/۲۹۴	۳/۰۱۵
pH	۳	۴۳۴/۴۹۶	۱۴۴/۸۳۲	۲۸/۹۰۵	۴۱۹/۴۶۴	۶۹/۱۹۳
خطا	۳	۱۵/۰۳۱	۵/۰۱			۱۲/۳۹۱
کل	۱۵	۶۰۶/۶۸۹				٪۱۰۰/۰۰

محیط بافردار، مانع کاهش pH می‌شود (۷). مطالعات کمی در مورد کشت قارچهای همزیست وجود دارد. توسعه روشهایی که قادر به کشت انبوه قارچهای همزیست باشد، می تواند در گسترش کاربرد آنها موثر باشد. با استفاده از محیط کشت کافر فاقد گلوکز، یک افزایش ۱۰۰ درصد در تولید بیومس قارچ *P. indica* و نیز یک کاهش ۷۰ درصد در زمان لازم برای رسیدن به حداکثر میزان اسپور در مقایسه با محیط اصلی کافر مشاهده شد (۷). زاهد و همکاران (۲) در کشت همزمان دو قارچ *Saccharamyces cerevisiae* و *Candida tropicalis* نشان دادند که عصاره مخمر بعنوان منبع نیتروژنی بهترین نتیجه را از لحاظ تولید زیست توده در مقایسه با سایر منابع نیتراتی دارد.

از آنجا که قارچ *P. indica* اولین قارچ همزیست شناخته شده است که قادر به رشد در ریشه یک گیاه زنده وهمچنین تحت کشت اگزنیک (بدون نیاز به میزبان) است، در نتیجه می‌توان از آن در شناسایی اساس مولکولی واکنش گیاه- میکروب استفاده نمود. از لحاظ اقتصادی و صنعتی کشت این قارچ برای تولید محصول بیشتر و به عنوان کود زیستی مورد نظر قرار گرفته است (۱۰). طبق نتایج به

Archive of SID

www.SID.ir

دست آمده از این پژوهش با توجه به تولید بیشتر وزن خشک قارچ و همچنین سنتز ساده و اقتصادی‌تر در محیط YPG نسبت به محیط کافر، می‌توان از محیط YPG به عنوان محیط کشت قارچ در مقیاس‌های بالاتر جهت مصارف صنعتی و به عنوان کود زیستی استفاده نمود. قارچ *P. indica* به عنوان کود، متعادل کننده و محافظت کننده زیستی در گیاهان عمل می‌کند که کشت آسان در محیطهای ساده و ارزان قیمت می‌تواند نقش به‌سزایی در کاربرد اقتصادی و مقرون به صرفه این قارچ همزیست در زمینه افزایش بازدهی گیاهان زراعی و دارویی داشته باشد (۱۵).

نتیجه گیری

این پژوهش با هدف گزینش یک محیط ساده برای تولید زیست توده قارچ *P. indica* انجام شد. این قارچ به عنوان کود زیستی شرایط رشد بهتر و مؤثرتر گیاهان را فراهم می‌کند. بنابراین کشت آسان در محیطهای ساده و ارزان قیمت می‌تواند نقش به سزایی در کاربرد اقتصادی و مقرون به صرفه این قارچ همزیست در زمینه افزایش بازدهی گیاهان زراعی و دارویی داشته باشد. تا کنون هیچ گزارشی مبنی بر استفاده از محیط YPG جهت رشد این قارچ مشاهده نشده است. نتایج این بررسی نشان می‌دهد محیط YPG به عنوان یک محیط ساده و ارزان قیمت باعث افزایش بیش از دو برابری تولید زیست توده قارچ *P. indica* می شود. با بهینه سازی شرایط کشت قارچ می‌توان تولید *P. indica* را در مقیاس صنعتی به منظور استفاده به عنوان کود زیستی امکان‌پذیر نمود.

منابع

۱. درویشی ف، حسینی ب، فتحی رضایی پ. ۱۳۹۴. بهینه سازی تولید لیپاز مخمر یاررووییا لیپولیتیکا با روش طراحی آزمایش تاگوچی. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی، جلد ۲۸، شماره ۳، ۳۴۳-۳۳۶.

۲. زاهد ا، جوزانی غ ص، خداییان ف. ۱۳۹۴. **بهینه سازی منبع ازت و میزان اکسیژن محلول برای تولید همزمان اتانول و زایلیتول در کشت همزمان دو مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida tropicalis***. مجله پژوهشهای سلولی و ملکولی. جلد ۲۸، شماره ۲: ۲۴۹-۲۳۷.

3. Bagde US, Prasad R, and Varma A, 2010; Interaction of Mycobiont: *Piriformospora Indica* with Medicinal plants and plants of Economic importance. African Journal of Biotechnology. 9 (54): 9214-9226.

4. Franken P, 2012; The plant strengthening root endophyte *Priformospora indica*: potential application and the bjology behind. Applied Microbiol Biotechnology. 96: 1455-1464.

5. Hill TW and Kafer E, 2001; Improved protocols for Aspergillus minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. Fungal Genetics Newsletter. 48: 20-21.

6. Kost G and Rexer KH, 2013; Morphology and Ultrastructure of *Piriformospora indica*. In Varma A, Kost G, and Oelmüller R, (eds). Piriformospora indica. Berlin Heidelberg: Springer; 25-36.

7. Kumar V, Sahai V, and Bisaria V, 2011; High-density spore production of *Piriformospora indica*, a plant growth-promoting endophyte, by optimization of nutritional and cultural parameters. Bioresource technology. 102 (3): 3169-3175.

8. Molitor A, and Kogel KH, 2009; Induced resistance triggered by *Piriformospora indica*. Plant signaling & behavior. 4 (3): 215-216.

9. Sahay NS, and Varma A, 1999; *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. FEMS Microbiology Letters. 181: 297-302.

10. Singh A, Rajpal K, Singh M, Kharkwal A. et al., 2013; Mass Cultivation of *Piriformospora indica* and Sebacina Species, in Varma A, Kost G, and Oelmüller R, (eds). *Piriformospora indica*, Berlin Heidelberg: Springer; pp. 377-392.

11. Singh A, Sharma J, Rexer KH, and Varma A, 2000; Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*

Archive of SID

www.SID.ir

– A revolutionary plant growth promoting fungus. Current Science. 79 (11): 1548-1554.

12. Unnikumar kR, Sree KS and Varma A, 2013; *Piriformospora indica*: a versatile root endophytic. Symbiosis. 60 (3): 107-113.
13. Varma, A, Bakshi M, Lou B, Hartmann A, et al., 2012; *Piriformospora indica*: A Novel Plant Growth-Promoting Mycorrhizal Fungus. Agric Res. 1(2): 117-131.
14. Varma A, Chordia P, Bakshi M and Oelmüller 2013; R, Introduction to Sebacinales, in Varma A, Kost G, and Oelmüller R,(eds). *Piriformospora indica*, Berlin Heidelberg: Springer; pp. 3-24.
15. Varma A, Sheramati I, Tripathi S, et al., 2012; The Symbiotic Fungus *Piriformospora indica*. Review. In Hock B (eds). Fungal Associations. 2nd Ed. Berlin: Springer; pp. 231-154.
16. Varm A, Singh A, Sahay NS, Sharma J, et al., 2001; *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. in Varma, A, Singh A, Sahay NS, Sharma J. Fungal Associations. Berlin Heidelberg: Springer; pp. 125-150.
17. Varma A, Verma S, Sudha, Sahay N, et al., 1999; *Piriformospora indica*: a Cultivable Plant-Growth-Promoting Root Endophyte. Applied and Environmental Microbiology; 65(6): 2741-2744.
18. Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G, 2001; Industrial Microbiology: An Introduction. Oxford, Blackwell Science; pp. 25-30.

Optimization of growth and biomass production in the endophytic fungus *Piriformospora indica*

Noora H., Shahabivand S., Karimi F., Aghaee A. and Darvishi F.

Biology Dept., Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

Absract

The endophytic fungus *Piriformospora indica* increases nutrient uptake in plants and allows plants to survive under biotic and abiotic stresses. This fungus stimulates growth and seed production of plants and increases the secondary metabolite contents of medicinal plants. There is little information on cultivation of symbiotic fungi therefore the development of methods to the mass culture of symbiotic fungi is very importance for practical applications. The aim of this study was to reveal a simple culture medium to higher biomass production for this fungus. A comparison of YPG simple medium and Kafer Complex medium was carried out on the dry weight of fungus. Then Taguchi method was used to design experiments for medium optimization to determine the effect of four factors including glucose, yeast extract and peptone concentrations, and pH on the fungal biomass production in a non-continuous culture. Comparison of the growth curve of the fungus in both the Kafer and YPG media showed that *P. indica* growth was better and higher in YPG medium. After optimization of YPG medium, biomass production was reached to 19/3 $g.L^{-1}$ in compared with the initial amount i.e. 16/2 $g.L^{-1}$. Our results suggested that YPG medium can be used as a suitable medium to *P. indica* industrial production for agricultural application, due to the higher biomass production of *P. indica* in YPG medium by 2.5-fold and its low cost in compare to Kafer medium.

Key words: Optimization, Biomass, *Piriformospora indica*,YPG medium.

Archive of SID

www.SID.ir