Archive of SID

www.SID.ir

سازمان جهاد دانشگاهی استان خراسان رضوی

مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

گزارش پایانی طرح پژوهشی:

گردآوری، شناسایی و طبقه بندی جمعیت های وحشی قارچ خوراکی بومی استان مازندران (زیست بانک قارچ های خوراکی ایران)

کد: ۱۱-۲۲۸۳

مسئول طرح:

حمید رضا پوریان فر

محمد علی آموزگار

گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی-مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

مشهد مقدس- خرداد ۱۳۹۷

Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات مسئول و همکاران طرح (مطابق با پروپوزال مصوب و به ترتیب میزان مشارکت)

الف) همکاران جهاددانشگاهی استان خراسان رضوی

نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی
حمید رضا پوریان فر	مجری	بیوتکنولوژی گیاهی (دکتری تخصصی)	استادیار پژوهش
ولی اله مهدیزاده	همکار اصلی (گردآوری نمونه‌ها، کلید مورفولوژیکی و شانسایی اولیه)	قارچ شناسی (دکتری تخصصی)	–
شادی شاه‌طهماسبی	همکار اصلی (کشت، خالص سازی و زراعی سازی)	علوم باغبانی (کارشناسی ارشد)	–
خلیل ملک زاده	همکار اصلی (تکمیل پروپوزال، ایده و دانش فنی)	بیوتکنولوژی کشاورزی (دکتری تخصصی)	استادیار
جواد جانپور	همکار	بیوتکنولوژی کشاورزی (دکتری تخصصی)	مربی پژوهش
شراره رضائیان	همکار	فیزیولوژی گیاهی (دکتری تخصصی)	استادیار پژوهش
مریم سادات یوسف ثانی	همکار	خاک شناسی (کارشناسی ارشد)	–
آتنا وفایی	همکار	فناوری زیستی غذایی (کارشناسی)	–
محمد فارسی	همکار	ژنتیک و اصلاح نباتات (دکتری تخصصی)	استاد
سید محسن نساج حسینی	همکار	بیماری شناسی گیاهی (دکتری تخصصی)	استادیار پژوهش

Archive of SID

www.SID.ir

ب) همکاران مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (مطابق با پروپوزال مصوب و به ترتیب میزان مشارکت)

نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی
محمد علی آموزگار	مجری	میکروبیولوژی (دکتری تخصصی)	استاد
سید ابوالحسن شاهزاده فاضلی	همکار اصلی	ژنتیک	دانشیار
محمد رضا صعودی	همکار اصلی	میکروبیولوژی	
مسلم پاپی زاده	همکار اصلی	میکروبیولوژی	
شقایق نصر	همکار اصلی	میکروبیولوژی	استادیار
آزاده شاهین پی	همکار	میکروبیولوژی	
محسن رضایی	همکار	میکروبیولوژی	
مشتاقی	همکار	میکروبیولوژی	
مهدی مشتاقی نیکو	همکار	میکروبیولوژی	
منصوره فرهنگ نیا	همکار	اپیدمیولوژی	

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده

با توجه به اهمیت استفاده از پتانسیل جمعیت‌های بومی قارچ‌های کلاهک‌دار در تحقیقات زیست-پزشکی، برنامه‌های اصلاحی، مطالعات تنوع زیستی و بررسی‌های ژنی، وجود مراکزی در کشور که نمونه‌های قارچ‌های بومی را به صورت زنده در شرایط استاندارد جهت حفظ خصوصیات اصلی نگهداری کنند، بسیار ضروری است. لذا این طرح با هدف جمع‌آوری نمونه‌های زنده قارچ‌های کلاهک‌دار از استان مازندران (که غنی از ذخایر ارزشمند قارچ‌های بومی است) با تمرکز بر قارچ‌های دارویی مهم انجام شد. نمونه‌برداری‌ها در بازه زمانی ۱۳۹۶-۱۳۹۴ از مناطق مختلف مازندران در طی ۴ دوره زمانی متفاوت در فصل‌های مختلف و هر منطقه ۲ بار انجام شد. اطلاعات مربوط به هر جدایه شامل شناسایی اولیه، مشخصات جغرافیایی، تغییرات رنگ و بو، نوع حلقه و اطلاعاتی درباره‌ی نحوه‌ی رشد (منفرد یا گروهی) و اطلاعات رویشگاه (خاک و گیاهان)، تغییر رنگ بافت قارچ با ایجاد خراش یا برش، ساختار حلقه، بو یا عطر و واکنش شافر ثبت شده و چندین تصویر از قسمت‌های مختلف هر نمونه گرفته شد. سپس در محل نمونه‌برداری، کشت بافت اولیه اندام باردهی روی حداقل دو نوع محیط کشت صرفا با هدف تولید میسلیوم زنده در کمترین زمان ممکن برای انتقال به آزمایشگاه مجهزتر انجام گرفت. همچنین خشک کردن نمونه‌ها و گرفتن نقش اسپور به منظور کاربرد در شناسایی بر اساس ریخت‌شناسی (بر پایه مشاهدات میکروسکوپی و ماکروسکوپی) انجام گردید. مجموعا ۱۹۸ نمونه قارچ کلاهک‌دار از جنس‌های مختلف جمع‌آوری شد که از این تعداد ۹۱ نمونه به‌صورت موفقیت‌آمیزی تولید میسلیوم زنده در محیط کشت نمودند و سایر جدایه‌ها از بین رفتند. بر اساس اطلاعات مورفولوژیکی بدست آمده در مراحل قبلی، تعداد ۶۲ جدایه تایید شدند. از این میان، ۵۲ عدد از طریق ابزار آنالیز توالی ITS تعیین جنس یا گونه شدند که پس از بررسی نتایج، مشخص شد که ۹ جدایه آسکومایست و ۴۳ جدایه بازیدیومایست بودند. ۵۷ جدایه نیز برای زراعی‌سازی (اهلی سازی) استفاده شد. مراحل زراعی‌سازی شامل خالص‌سازی در محیط کشت جامد (با استفاده از ۴ نوع محیط کشت PDA, CEA, MGA, YPG)، تولید اسپاون در دانه گندم یا خاک اره، تولید کشت تعلیقی میسلیوم (در یک نوع محیط کشت MGA برای تولید بیوماس میسلیومی) و بررسی امکان تولید اندام زایشی قارچ در بستر کشت (یک نوع بستر کشت مبتنی بر تراشه چوب) بودند. همچنین شاخص‌هایی همچون نوع بافت میسلیوم (رشته‌ای، پنبه‌ای، کرکی یا بدون میسلیوم هوایی)، سرعت رشد شعاعی، تراکم، رنگ و شکل هندسی میسلیوم مورد بررسی قرار گرفته و داده‌ها از نظر آماری با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج حاکی از تفاوت معنی‌دار در بین جدایه‌ها و در بین محیط‌های کشت از نظر شاخص‌های فوق بود. در بین محیط‌کشت‌های مورد استفاده، دو محیط کشت PDA و MGA بهترین شرایط رشدی برای رشد میسیلیوم جدایه‌های قارچ بومی مورد مطالعه را داشتند ($p \leq 0.05$). آزمون

Archive of SID

www.SID.ir

میوه‌دهی نشان داد که جدایه‌های مربوط به ۷ جنس مختلف بازیدیومایستی موفق به تولید اندام بـاردهی در بستر کشت شدند، شامل:

Donkia pulcherrima, Lenzites tricolor, Ganoderma tsugea, Cyclocybe sp. Pholiota aurivella, Trametes sp و *Daedaleopsis tricolor*.

تمامی ۶۲ جدایه تایید شده در این پژوهش به صورت کشت خـالص میسـلیومی و قابـل تکثیـر نگهـداری می‌شود تا در تحقیقات بعدی در صورت نیاز مورد استفاده قرار گیرد. همچنین بررسی منابع نشان داد که ۷ جدایه‌ای که در این تحقیق زراعی سازی شدند دارای خواص ضـد میکروبـی و ضـد سـرطانی بـوده و در تحقیقات زیست-پزشکی اهمیت فراوانی دارند. لذا موفقیت در زراعی سازی این جدایه‌ها در بستر کشـت مصنوعی ابزار تحقیقاتی مورد نیاز برای بررسی اثرات بیولوژیکی آنها را فراهم می‌کند.

کلید واژگان:

مازندران، قارچ‌های بومی کلاهک‌دار، نمونه برداری، ITS، زراعی سازی، کشت خالص میسـلیومی، زیسـت بانک قارچ‌های بومی

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مطالب

پیش گفتار ۱

فصل اول: کلیات پژوهش ۴

فصل دوم: پیشینه تحقیق ۱۰

۲-۱- گیاهان، جانوران و جغرافیای زیستی ایران ۱۰

۲-۲- آشنایی با اقلیم استان مازندران ۱۰

۲-۳- سیر تکاملی شناسایی گونه‌های قارچ‌های ماکروسکوپی ۱۲

۲-۴- جمع آوری و ثبت گونه‌های قارچی ماکروسکوپی در استان‌های ایران ۱۴

۲-۵-مراکز جمع‌آوری و ثبت گونه‌های قارچی ماکروسکوپی در ایران..... ۱۷

۲-۶-مراکز و پروژه‌های جمع‌آوری و ثبت قارچ‌های ماکروسکوپی در کشورهای دیگر..... ۱۸

۲-۶-۱- فونگاریوم کیو(KW's Fungarium) ۱۸

۲-۶-۲- هرباریم دانشگاه بریتیش کلمبیا (University of British Columbia Herbarium , UBC) ۱۸

۲-۶-۳- بانک منبع قارچ‌های کلاهک دار کشور کره (Korea Mushroom Resource Bank KMRB) ۱۹

۲-۶-۴- قارچ‌های کالیفرنیا (The Fungi of California) ۱۹

۲-۶-۵- قارچ‌های کلرادو (COLORADO MUSHROOM) ۱۹

۲-۶-۶- کلکسیون ATCC آمریکا (American Type Culture Collection) ۲۰

۲-۶-۷- قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه دنیزلی ترکیه..... ۲۰

۲-۶-۸- قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه Black Hills ایالت داکوتای جنوبی (آمریکا) ۲۰

۲-۶-۹- قارچ‌های ماکروسکوپی کاستاریکا..... ۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۲

۳-۱- نمونه‌برداری ۲۲

۳-۱-۱- مناطق و زمان‌های نمونه‌برداری ۲۲

۳-۱-۲- ثبت مشخصات و شناسایی تخمینی نمونه‌ها در هنگام جمع‌آوری ۲۳

۳-۱-۲-۱- عکسبرداری از نمونه‌ها ۲۳

۳-۱-۲-۲- آزمون‌های شیمیایی ۲۳

۳-۱-۲-۳- برش طولی ۲۴

۳-۲- کشت بافت و خالص‌سازی اولیه نمونه‌ها ۲۵

۳-۲-۱- تهیه محیط کشت ۲۶

۳-۲-۲- کشت بافت اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده ۲۶

۳-۲-۳- خالص سازی اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده ۲۷

۳-۲-۴- نگهداری نمونه‌های زنده خالص شده ۲۷

۳-۲-۵- خشک‌کردن نمونه‌ها برای کاربردهای مختلف ۲۷

۳-۳- شناسایی بر اساس ریخت شناسی نمونه خشک (پس از جمع‌آوری) ۳۰

۳-۳-۱- شناسایی مبتنی بر مشاهدات میکروسکوپی ۳۰

۳-۳-۲- شناسایی مبتنی بر مشاهدات ماکروسکوپی ۳۱

۳-۴- شناسایی مولکولی سویه‌ها ۳۱

۳-۴-۱- استخراج DNA ۳۱

۳-۴-۲- کنترل کیفیت DNA استخراج شده ۳۳

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۴-۳- تکثیر توالی ITS ۳۳
۳-۵- کشت و خالص سازی نهایی سویه‌های تعیین گونه شده ۳۵
۳-۵-۱- تهیه محیط کشت ۳۵
۳-۵-۲- خالص‌سازی و واکشت میسلیوم ۳۸
۳-۵-۳- بررسی مشخصات رشدی میسلیوم ۴۰
۳-۶- تهیه اسپاون از کشت‌های خالص ۴۰
۳-۶-۱- تهیه اسپاون بر پایه دانه غلات ۴۰
۳-۶-۲- تهیه اسپاون بر پایه گندم-خاک اره ۴۲
۳-۷- زراعی‌سازی گونه‌های مهم قارچ‌های کلاهک‌دار بومی ۴۴
۳-۸-کشت معلق میسلیوم ۴۵
۳-۹- آنالیز آماری و حجم نمونه مورد بررسی ۴۶
فصل چهارم: یافته‌های تحقیق ۴۹
۴-۱- مشخصات اولیه قارچ‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف استان مازندارن ۴۹
۴-۱-۱- جنگل‌های نور و رویان ۴۹
۴-۱-۲- نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا (شرق مازندران) ۵۶
۴-۱-۳- نمونه‌برداری از جنگل‌های نور، چالوس و رامسر ۶۸
۴-۱-۴- نمونه‌برداری از جنگل‌های رامسر، بهشهر، ساری، کلاردشت ۷۴
۴-۲- کلید مورفولوژیکی جدایه‌های قارچ ۷۹
۴-۳- آنالیز توالی **ITS** ۸۰
۴-۳-۱- استخراج DNA ۸۰

Archive of SID
www.SID.ir

۴-۳-۲- تایید مولکولی گونه‌ها ۸۲

۴-۴- زراعی‌سازی جدایه‌های تایید گونه شده ۸۸

۴- ۴-۱- زراعی‌سازی سری الف (۹ نمونه) تایید گونه شده ۸۹

۴-۴-۱-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری الف) ۸۹

۴-۴-۱-۲- تولید اسپاون (سری الف) ۹۳

۴-۴-۱-۳- کشت معلق میسلیوم (سری الف) ۹۴

۴- ۴-۲- زراعی‌سازی سری ب (۱۰ نمونه) تایید گونه شده ۱۰۶

۴-۴-۲-۱- بررسی شاخصهای رشدی میسلیوم (سری ب) ۱۰۶

۴-۴-۲-۲- رشد اسپاون (سری ب) ۱۱۰

۴-۴-۲-۳- کشت معلق میسلیوم (سری ب) ۱۱۰

۴-۴-۳- زراعی‌سازی سری ج (۱۲ نمونه) تایید گونه شده ۱۲۷

۴-۴-۳-۱- بررسی شاخصهای رشدی میسلیوم (سری ج) ۱۲۷

۴-۴-۳-۲- تولید اسپاون (سری ج) ۱۳۳

۴-۴-۳-۳- کشت معلق میسلیوم(سری ج) ۱۳۳

۴- ۴-۴- زراعی‌سازی سری د (۱۵ نمونه) تایید گونه شده ۱۵۰

۴-۴-۴-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری د) ۱۵۰

۴-۴-۴-۲- تولید اسپاون (سری د) ۱۵۷

۴-۴-۴-۳- کشت معلق میسلیوم (سری د) ۱۵۷

۴-۴-۵- زراعی سازی سری ه (۱۱ نمونه) تایید گونه شده ۱۸۱

۴-۴-۵-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری ه) ۱۸۱

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۴-۵-۲- رشد اسپاون (سری ه) ۱۸۶

۴-۴-۵-۳- کشت معلق میسلیوم (سری ه) ۱۸۷

۴-۵- بررسی امکان تولید اندام باردهی گونه‌های مهم ۲۰۷

فصل پنجم: تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق ۲۱۵

فهرست منابع و ماخذ ۲۲۴

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست جداول

جدول ۳-۱- توالی پرایمرهای عمومی **ITS1** و **ITS4** ۳۳

جدول ۳-۲- ترکیب اجزای واکنش پلیمرازی ۳۴

جدول ۴-۱- مشخصات اولیه ۲۴ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری اول از جنگل‌های نور و رویان ۵۰

جدول ۴-۲- مشخصات اولیه ۳۷ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا ۵۷

جدول ۴-۳- مشخصات اولیه ۲۷ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری از نور، چالوس و رامسر ۶۹

جدول ۴-۴- مشخصات اولیه ۴۲ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری اول (آبان ۹۵) ۷۵

جدول ۴-۵- نتایج آنالیز شباهت توالی جدایه‌های بومی در برنامه **BLASTn** ۸۳

جدول ۴-۶- جمع‌بندی نمونه برداری قارچ‌های کلاهک‌دار از استان مازندران ۸۷

جدول ۴-۷- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۹ جدایه قارچ وحشی(سری الف) ۹۶

جدول ۴-۸- شاخصه های رشدی بررسی شده ۹ جدایه قارچ وحشی (سری الف) ۱۰۰

جدول ۴-۹- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۰ جدایه قارچ وحشی (سری ب) ۱۰۶

جدول ۴-۱۰- شاخصه های رشدی بررسی شده ۱۰ جدایه قارچ وحشی (سری ب) ۱۲۰

جدول ۴-۱۱- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۲ جدایه قارچ وحشی (سری ج) ۱۲۷

جدول ۴-۱۲- شاخصه های رشدی بررسی شده ۱۲ جدایه قارچ وحشی (سری ج) ۱۴۴

جدول ۴-۱۳- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۵ جدایه قارچ وحشی (سری د) ۱۵۰

جدول ۴-۱۴- شاخصه های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی (سری د) ۱۷۱

جدول ۴-۱۵- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۱ جدایه قارچ وحشی (سری ه) ۱۸۱

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴-۱۶- شاخصه های رشدی بررسی شده ۱۱ جدایه قارچ وحشی (سری ه)..... ۱۹۷

جدول ۴-۱۷- مقایسه میانگین سرعت رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ بومی..... ۲۰۵

جدول۴-۱۸- نتایج زراعی‌سازی ۵۷ جدایه بومی قارچ کلاهک‌دار استان مازندران ۲۱۲

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست اشکال

شکل ۳-۱- نقشه استان مازندران جهت انتخاب مکان‌های نمونه‌برداری ۲۲

شکل ۳-۲- خشک کردن و نگهداری برخی از نمونه‌ها در الکل ۲۹

شکل ۳-۳- تهیه و نگهداری نقش اسپور برخی از نمونه‌ها..... ۲۹

شکل ۳-۴- برنامه واکنش پلیمرازی جهت تکثیر قطعه **ITS**. ۳۴

شکل ۳-۵- تهیه محیط کشت و توزیع آن در پتری‌دیش، عکس از آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد ۳۷

شکل ۳-۶- انجام واکشت از نمونه‌های قارچ‌های بومی تعیین گونه شده ۳۹

شکل ۳-۷- تهیه اسپاون قارچ‌های بومی بر پایه دانه غلات ۴۱

شکل ۳-۸- تهیه اسپاون قارچ‌های بومی بر پایه مخلوط گندم-خاک اره ۴۳

شکل ۴-۱- تصاویر اصلی برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های نور و رویان (الف تـا د) ۵۵

شکل ۴-۲- تصاویر اصلی برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های بابل، ساری و نکا (الـف تا ض)..... ۶۷

شکل ۴-۳- تصاویر برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های نور، چالوس و رامسر (الف تـا ث)..... ۷۳

شکل ۴-۴- تصاویر برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از رامسر، بهشهر، ساری، کلاردشت ۷۸

تصویر ۴-۵- نمونه‌ای از DNA استخراج شده از یکی از ایزوله های قارچ کلاهک‌دار بر روی ژل آگارز ۸۱

شکل ۴-۶- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه های قارچ بومی (سری الف).....

شکل ۴-۶ (مکرر) نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط های کشت مختلف (سری الـف) (در ۴ گونه قارچی که تفاوت معنی‌داری نشان دادند)..... ۹۷

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۷ (الف)- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری الف) ۹۸

شکل ۴-۸ (الف)- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپاون دانه‌های گندم. (سری الف) ۱۰۳

شکل ۴- ۹- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه های قارچ بومی (سری ب) ۱۱۱

شکل ۴-۱۰- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ب) ۱۱۲

شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه های قارچ بومی در محیط های کشت مختلف (سری ب) ۱۱۵

شکل ۴-۱۲- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ب)..... ۱۲۴

شکل ۴-۱۳- کشت معلق میسلیوم در برخی از جدایه های قارچهای بومی (سری ج) ۱۳۴

شکل ۴-۱۴- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ج) ۱۳۵

شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ج) ۱۳۸

شکل ۴-۱۶- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ج) ۱۴۸

شکل ۴-۱۷- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه های قارچ بومی (سری د) ۱۵۹

شکل۴-۱۸- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری د) ۱۶۰

شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د) ۱۶۳

شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونههای قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری د) ۱۷۶

شکل ۴-۲۱- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه های قارچهای بومی (سری ه) ۱۸۸

شکل ۴-۲۲- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ه) ۱۹۰

شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه) ۱۹۱

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۴-۲۴- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ه) ۲۰۱

شکل ۴-۲۵- اندام باردهی برخی از جدایه های قارچهای بومی..... ۲۰۹

Archive of SID

www.SID.ir

پیش گفتار

قارچ‌ها (Fungi) با تنوع گونه‌ای غنی و بالایی که دارند یکی از بزرگترین گروه‌های موجودات زنده روی زمین محسوب می‌شوند و بخش مهمی از اکوسیستم زنده را تشکیل می‌دهند. گونه‌های بسیاری از آن‌ها نقش‌های کلیدی در فرایندهای اکوسیستمی و چرخه زیستی طبیعت (تجزیه‌کنندگی و پوسیدگی) دارند. قارچ‌ها به‌عنوان یک گروه کمتر شناخته‌شده از موجودات زنده مطرح هستند و کسب دانش بیشتر در مورد آن‌ها به دلایلی همچون طبیعت نهان‌زی، ظهور دوره‌ای و دوره کوتاه تولید اندام میوه‌دهی مشکل می‌باشد. از دوره باستان و حتی ماقبل تاریخ، قارچ‌ها مورد توجه انسان‌ها بوده‌اند و به خاطر ترکیبات متنوعی که تولید می‌کنند مقبولیت زیادی داشته و مورد استفاده قرار می‌گرفتند. در میان قارچ‌ها، قارچ‌های عالی ماکروسکوپی که اندام میوه‌دهی قابل رویت تولید می‌کنند اهمیت خاصی دارد. این بخش از قارچ‌ها به نام Higher Fungi، Macroscopic Fungi و یا Mushrooms شهرت دارند. مشخصه مشترک تمامی گونه‌های متعلق به این نوع قارچ‌ها آن است که اندام میوه‌دهی آنها قابل رویت بوده و از نظر حجم به قدر کافی بزرگ هستند تا نیازی به استفاده از میکروسکوپ نباشد. قارچ‌های ماکروسکوپی کاربرد بسیار زیادی در صنایع مختلف (شیمیایی، غذا، دارو و غیره) و همچنین در سلامت و تغذیه انسان دارند.

شناسایی، توصیف و حفظ دقیق قارچ‌های ماکروسکوپی، نظیر هر موجود زنده دیگری، کلید دستیابی به فهم بیشتر از آن‌ها خواهد بود. در این ارتباط، مجموعه‌های نگهداری ژرم پلاسم زنده نقش بنیادینی در شناسایی دقیق و نگهداری کامل آن‌ها دارد. در حقیقت، برای انجام بسیاری از برنامه‌های اصلاحی و ایجاد هیبریدهای زراعی، مطالعات تنوع زیستی و بررسی‌های ملکولی ضروری است که نمونه‌های زنده قابل آزمایش در دسترس باشد. بنابراین وجود مراکزی که نمونه‌های زیستی را از فلور طبیعی جمع آوری نماید

Archive of SID

www.SID.ir

و این نمونه‌ها را در شرایط استاندارد جهت حفظ خصوصیات اصلی نگهداری کنند، بسیار ضروری است. در سطح ملی و بین‌المللی تا حدود زیادی در مورد نگهداری و حفاظت منابع تنوع قارچی غفلت و چشم‌پوشی شده است. در چند دهه اخیر با شناخت اهمیت نقش تنوع زیستی در حمایت از زندگی بشر و نگرانی عمیقی که در مورد کاهش تنوع زیستی وجود دارد، برنامه‌های حفظ و نگهداری از تنوع زیستی و ازجمله قارچ‌ها در جهان موردتوجه قرار گرفته است.

حفظ و ذخیره ذخایر ژنومی قارچ‌های ماکروسکوپی برای هر کشوری اهمیتی استراتژیک دارد. بسیاری از کشورها به‌ویژه آمریکا، چین، هند، ترکیه و کره جنوبی اهتمام ویژه‌ای به موضوع ذخایر ژنومی قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار در کشور خود داشته‌اند. در کشور ما نیز تلاش‌های ارزنده‌ای توسط وزارت جهاد کشاورزی و مراکز مرتبط با آن برای جمع آوری قارچ‌های کلاهک‌دار در کنار قارچ‌های میکروسکوپی انجام‌شده است. در گذشته این تلاش‌ها غالبا معطوف به نمونه‌های هرباریومی بوده اما در سال‌های اخیر نمونه‌های زنده نیز جمع آوری و نگهداری شده است. با وجود این، همچنان مرکزی که به طور تخصصی متمرکز بر جمع آوری، شناسایی دقیق مولکولی و ارائه نمونه‌های زنده به متقاضیان بوده و قادر به ارائه اطلاعات تخصصی در خصوص نحوه کشت و زراعی سازی نژادها باشد، در کشور ما ایجاد نشده است.

در حال حاضر، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (به عنوان یکی از متولیان اصلی گردآوری و حفظ و ارزیابی ذخایر ژنومی نمونه‌های زیستی گیاهی و جانوری در کشور) با همکاری گروه پژوهشی زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی (که در زمینه به‌نژادی و تحقیقات زیست-پزشکی قارچ‌های کلاهک‌دار ماکروسکوپی فعالیت دارد)، اهتمام ویژه‌ای به ایجاد بانک ژنومی قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار دارند. بر این اساس، این طرح پژوهشی گامی نخست در این راه با تمرکز بر استان مازندران بوده و هدف آن جمع آوری، شناسایی، ذخیره‌سازی و کشت و خالص سازی گونه‌های مهم قارچ‌های کلاهک‌دار ماکروسکوپی در استان مازندران و تلاش برای زراعی سازی برخی از آنها (که قابلیت زراعی سازی داشته و اهمیت اقتصادی

Archive of SID

www.SID.ir

و دارویی دارند) می‌باشد. بدون شک فرصت این طرح (با توجه به آنکه حجم زیادی از آن صرف جمع آوری نمونه‌های قارچ در فصول مختلف شده است) اجازه انجام تمامی تحقیقات ممکن بر روی همه نمونه‌ها را نمی‌دهد ولی دستاوردهای آن برای بسیاری از پژوهش‌های آینده بر روی کشت و خالص سازی، بومی سازی، اصلاح ژنتیکی، زراعی سازی و شناسایی ترکیبات دارای اثرت بیولوژیکی مفید می‌باشد. این طرح همچنین می‌تواند گامی مهم برای تداوم این فعالیت در سایر استان‌ها باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول: کلیات پژوهش

تا یک دهه گذشته، تصور می‌شد که تعداد گونه‌های قارچ سراسر جهان حدود ۱/۵ میلیون گونه است (Hawksworth., 1991). اما امروزه این تخمین با توجه به پیشرفت‌های تکنیک‌های مولکولی (به‌ویژه بر اساس توالی یابی‌های دقیق) تا ۵/۵ میلیون گونه افزایش یافته است (Blackwell, 2011). تخمین‌های اخیر همچنین نشان می‌دهد که از این تعداد، ۱۶۰–۱۵۰ هزار گونه قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار هستند که تنها در حدود ۱۰٪ آن‌ها (یعنی ۱۶–۱۵ هزار گونه) دارای تاکسونومی مشخص و شناخته شده هستند (Wasser, 2014). این در حالیست که تعداد قارچ‌هایی که قابلیت زراعی‌سازی و پرورش دارند تنها ۲۰۰ گونه است و تعداد گونه‌هایی که به‌صورت صنعتی و تجاری کشت می‌شوند حتی از این هم کمتر بوده و به ۱۰ عدد هم نمی‌رسد (Wasser, 2014). در میان قارچ‌های مورد کشت صنعتی، ۵ جنس اصلی در حدود ۸۵ ٪ از تولید جهانی این قارچ‌ها را به خود اختصاص می‌دهند. این ۵ جنس عبارتند از جنس *Agaricu* (غالباً گونه قارچ دکمه‌ای)، جنس *Pleurotus* (که به نام گونه‌های صدفی مشهور هستند و برخی از گونه‌های آن نظیر قارچ شاه‌صدف جزء قارچ‌های دارویی محسوب می‌شوند)، جنس *Lentinula* (غالباً گونه شی‌تاکه)، جنس *Auricularia* و جنس *Flammulina* (غالباً گونه انوکی‌تاکه). لذا تعداد قارچ‌های کلاهک‌دار زراعی و دارای خواص دارویی شناخته شده در حال حاضر، بسیار کمتر از ظرفیت کل قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار است. با توجه به تحقیقات و مطالعات گزارش شده در سطح دنیا، قطعاً در آینده تعداد بیشتری از قارچ‌های کلاهک‌دار در زمره قارچ‌های زراعی و دارویی درخواهند آمد و این موضوع خود یک ظرفیت و قدرت رقابتی برای کشورها ایجاد خواهد کرد. لذا این موضوع اهمیت شناسایی، ذخیره سازی و تلاش

Archive of SID

www.SID.ir

برای زراعی سازی ژرم پلاسم زنده نمونه‌های بومی قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک دار و ظرفیت بالای تحقیقاتی آن‌ها را در کشور ما نشان می‌دهد.

مصرف قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار به‌منظور استفاده از خصوصیات دارویی آن‌ها در فرهنگ‌های مختلف جهان، تاریخچه‌ای هزارساله دارد (Hobbs, 1995). از نظر مصرف انسانی (اتنومایکولوژی[1])، قارچ‌های کلاهک‌دار به گروه‌های مختلف خوراکی، دارویی، سمی و توهم‌زا تقسیم می‌شوند (عزیزی و همکاران، ۱۳۹۰). اگرچه ممکن است برخی از آن‌ها به نوعی در بیشتر از یک گروه قرار بگیرند. به عنوان مثال، یک قارچ کلاهک‌دار دارویی ممکن است خوراکی باشد (نظیر شی‌تاکه)، درحالی‌که قارچ دیگر دارویی ممکن است غیر خوراکی اما درعین‌حال غیر سمی باشد (مانند قارچ گانودرما). برخی نیز متعلق به گروه سمی یا توهم‌زا هستند اما درعین‌حال ممکن است جنبه‌های دارویی مهمی نیز داشته باشند. همچنین به دلیل حساسیت‌های مختلف در میان مردم کشورهای مختلف و حتی درون یک کشور، گاهی برخی از گونه‌ها خوراکی و برخی دیگر غیر خوراکی و یا حتی سمی قلمداد شده است. لذا به دلیل این پیچیدگی‌های مصرف انسانی، اختصاص یک تعریف ساده برای یک شکل مصرف برای قارچ‌های کلاهک دار عملاً امکان‌پذیر نیست. علیرغم پیچیدگی اتنومایکولوژیکی قارچ‌های کلاهک‌دار، همچنان برای سادگی مطالعه و تقسیم‌بندی آن‌ها می‌توان گروه‌های زیر را برشمرد:

۱. قارچ‌های خوراکی[2]: قارچ‌هایی که عمدتاً به‌صورت تازه مصرف خوراکی دارند مانند قارچ دکمه‌ای سفید[3]. این قارچ‌ها ممکن است خواص تغذیه‌ای و حتی دارویی مفیدی نیز داشته باشند.

۲. قارچ‌های دارویی[4]: قارچ‌هایی که خصوصیات دارویی شاخصی در آن‌ها شناسایی شده است. این قارچ‌ها ممکن است به‌صورت تازه مصرف شوند یا آن‌که به‌صورت پودر خشک، مکمل غذایی و یا

[1] Ethnomycology
[2] Edible Mushrooms
[3] *Agaricus bisporus*

Archive of SID
www.SID.ir

مشابه گیاهان دارویی به فرم‌های دم‌کرده و جوشانده استفاده شوند. بسیاری از این قارچ‌ها از قرن‌ها پیش از میلاد به‌صورت سنتی در کشورهای شرق دور مصرف می‌شده‌اند. برخی از این قارچ‌ها ممکن است به‌صورت تازه خوری مصرف داشته باشند و برخی ممکن است به‌صورت مواد دارویی مصرف شوند.

۳. قارچ‌های سمی[5]: قارچ‌هایی هستند که گزارش‌هایی مبنی بر مسمومیت‌زایی آن‌ها برای انسان وجود دارد مانند قارچ آمانیتا[6].

- قارچ‌های توهم‌زا[7]: قارچ‌هایی که بر سیستم اعصاب انسانی اثر می‌گذارد و حالاتی نظیر سرخوشی را ایجاد می‌کند. برخی از این قارچ‌ها حتی برای درمان بیماری‌هایی همچون افسردگی و سردردهای میگرنی استفاده می‌شوند (نظیر قارچ‌هایی از گونه *Psilocybe* spp. که با تولید ماده‌ای به نام Psilocin به پذیرنده $5\text{-}HT_{2A}$ (که یک نوع پذیرنده سروتونین است) متصل می‌شود و اثراتی شبیه به سروتونین ایجاد می‌کند (حالاتی نظیر سرخوشی).

در حال حاضر، بسیاری از فرآورده‌های دارویی به دست آمده از قارچ‌های کلاهک‌دار توسط شرکت‌های بزرگ دارویی در ژاپن، کره و چین تولید و مصرف می‌شوند. در جهان غرب نیز، قارچ‌های کلاهک‌دار از لحاظ ارزش غذایی و دارویی به‌طور فزاینده‌ای مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. برخی از آن‌ها امید زیادی را به لحاظ داشتن خواص تعدیل‌کننده ایمنی، ضد سرطان، قلبی- عروقی، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد انگل و محافظت کننده در برابر هپاتیت و کنترل قند بوجود آورده‌اند. ترکیبات اصلی موجود در قارچ‌های کلاهک‌دار که دارای خواص زیستی به‌ویژه علیه سلول‌های سرطانی و نقش تنظیم کننده ایمنی دارند، غالباً متعلق به گروه‌های پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و ساختارهای پیچیده پپتیدی-پلی‌ساکاریدی

[4] Medicinal Mushrooms
[5] Poisonous Mushrooms
[6] *Amanita phalloides*
[7] Hallucinogenic Mushrooms

Archive of SID
www.SID.ir

می‌باشند. برخی از آن‌ها نیز نظیر قارچ *Trametes versicolor* از FDA آمریکا مجوز انجام آزمایشات بالینی برای کمک به کاهش عوارض شیمی درمانی سرطان پیشرفته پستان (۲۰۰۷) و پروستات (۲۰۱۳) دریافت داشته‌اند (Torkelson *et al.*, 2012).

بنابراین، قارچ‌های کلاهک‌دار ماکروسکوپی در تمامی طبقه‌بندی‌های خود (خوراکی، دارویی، سمی و توهم‌زا) دارای خواص تغذیه‌ای، دارویی، صنعتی و تجاری شایان توجهی هستند. این موضوع نشان می‌دهد نگهداری ژرم پلاسم زنده قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار نقش بنیادینی در شناسایی دقیق خواص آن‌ها و استفاده کاربردی از آن‌ها دارد. در حقیقت، برای انجام بسیاری از تحقیقات زیست-پزشکی، برنامه‌های اصلاحی، مطالعات تنوع زیستی و بررسی‌های مولکولی ضروری است که نمونه‌های زنده قابل آزمایش در دسترس باشد؛ بنابراین وجود مراکزی که نمونه‌های زیستی را از فلور طبیعی جمع آوری نماید و این نمونه‌ها را در شرایط استاندارد جهت حفظ خصوصیات اصلی نگهداری کنند، بسیار ضروری است. به عنوان مثال میزان تنوع در نژادهای تجاری قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید که مهم‌ترین و رایج‌ترین قارچ زراعی- تجاری در دنیا است به شدت کم بوده و این قارچ به نوعی، تک کشتی شده است. منابع اصلی نژادی در این قارچ، دو نژاد هیبرید U1 و U3 هستند و اسپاون مورد استفاده در بیشتر واحدهای پرورش قارچ در سراسر دنیا، از این دو نژاد مشتق شده‌اند. تک کشتی شدن این قارچ، ناهنجاری‌های رشدی و انحطاط نژادی در میسلیوم رویشی و اندام‌های میوه‌دهی، کاهش عملکرد و احتمال آسیب گسترده ناشی از طغیان آفات و بیماری‌ها را افزایش داده است (فارسی و پوریان‌فر، ۱۳۹۰). از این رو، از اواخر دهه ۱۹۸۰، برنامه‌های تحقیقاتی متعددی در بیشتر کشورهای پیشرفته برای بازیابی بنیه نژادی و افزایش تنوع در این قارچ با استفاده از ذخایر ژنومی نژادهای وحشی، اجرا شده است (فارسی و پوریان‌فر، ۱۳۹۰). در این راستا، مراکز بزرگ بین المللی تحقیقاتی و تولیدکنندگان اسپاون قارچ‌های خوراکی، اهتمام زیادی برای دریافت و گردآوری نژادها و گونه‌های وحشی قارچ‌های خوراکی از سایر کشورها دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

تحقیقات منتشر شده متعددی در کشور ما نشان می‌دهد (آصف شایان، ۱۳۹۴) که کشورمان دارای ذخایر غنی از قارچ‌های کلاهک‌دار در بیشتر استان‌ها می‌باشد. تلاش‌های ارزنده‌ای نیز در جهت گردآوری و ذخیره‌سازی گونه‌های متعدد از این قارچ‌ها انجام شده است. با وجود این، بیشتر این ذخایر به‌صورت هرباریومی بوده و یا آن که به‌صورت محدودی فرم زنده آن‌ها نگهداری می‌شود و کمتر به طور تقاضا محور در دسترس محققان می‌باشد. همچنین، تائید گونه نمونه‌های جمع‌آوری شده غالباً از روش‌های غیر مولکولی بوده است. از سویی، بسیاری از این قارچ‌ها زراعی‌سازی نشده‌اند. این در حالی است که برای انجام هرگونه مطالعات بر روی قارچ‌های بومی، یکی از ملزومات اصلی در اختیار داشتن کشت خالص میسلیومی و گاهی اندام‌های باردهی برای عصاره گیری و مطالعات مرتبط است. درصورتی‌که تنها با در اختیار داشتن اندام باردهی اولیه جمع آوری شده از طبیعت، امکان تکرار مطالعه و افزایش دقت و حجم آزمایشات بسیار محدود خواهد شد.

با جمع‌بندی مطالب عنوان شده در بالا، در حال حاضر در ارتباط با قارچ‌های ماکروسکوپی بومی ایران ۳ نکته مهم و خلاء تحقیقاتی وجود دارد:

۱- تعداد کل قارچ‌های کلاهک‌دار ماکروسکوپی دارای قابلیت زراعی، دارویی یا صنعتی بسیار بیشتر از چند گونه محدود تجاری کنونی است. لذا کشف، شناسایی، گردآوری و ذخیره نمونه‌های بومی همیشه یک ظرفیت و قدرت رقابتی برای کشور ما ایجاد خواهد کرد.

۲- قارچ‌های کلاهک‌دار ماکروسکوپی دارای خواص متنوع و گسترده تغذیه‌ای، دارویی، صنعتی و تجاری هستند. نمونه‌های زنده مورد تائید قابل آزمایش در دسترس (و نه نمونه‌های هرباریومی یا کشت‌هایی که خالص نیستند و یا آن‌که امکان عرضه به محققین را ندارند)، شرط اولیه برای انجام بسیاری از تحقیقات بر روی خواص تغذیه‌ای، زیست-پزشکی، برنامه‌های اصلاحی، مطالعات تنوع زیستی و بررسی‌های مولکولی است.

Archive of SID

www.SID.ir

۳- بسیاری از مقالات منتشر شده بر روی ارقام بومی قارچ‌های کلاهک‌دار در کشور ما قابل تکرار و راستی آزمایی نیستند چراکه تائید گونه نمونه‌های جمع‌آوری شده گاها از روش‌های غیر دقیق مولکولی بوده و از سویی، بسیاری از این قارچ‌ها زراعی‌سازی نشده‌اند (که منجر به محدودیت در آزمایشات نیازمند به اندام میوه‌دهی می‌شود).

لذا پژوهش حاضر در نظر دارد برخی از توده‌های قارچ‌های کلاهک‌دار بومی استان مازندران (به‌عنوان یکی از استان‌های غنی از ذخایر بومی قارچ‌های کلاهک‌دار) را جمع آوری کرده و پس از طبقه‌بندی و ارزیابی صفات کلیدی، از ظرفیت بالای زراعی (تولید اندام باردهی)، اصلاحی و دارویی این نژادها بهره برداری نماید. این طرح در صورت موفقیت، سرمایه‌ای گرانبها برای پژوهش‌های علمی کشور در آینده فراهم خواهد آورد.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم: پیشینه تحقیق

۲-۱- گیاهان، جانوران و جغرافیای زیستی ایران

طبیعت و اقلیم متنوع ایران در خود گیاهان و جانوران فراوانی را جای داده است که هم از نظر تعداد و هم از نظر تنوع در مقایسه با سایر نقاط جهان شگفت‌انگیز است. به‌عنوان مثال تعداد گونه‌های پستانداران وحشی ایران با ۱۶۸ گونه تقریباً با تعداد کل گونه‌های پستاندار در قاره اروپا برابر است. همچنین در ایران ۸۰۰۰ گونه گیاهی، ۱۷۴ گونه ماهی، ۲۰ گونه دوزیست، خزنده و ۵۱۴ گونه پرنده زیست می‌کنند. هرکدام از گیاهان و جانوران در منطقه خاصی یافت می‌شوند که زیستگاه نامیده می‌شود و محدوده پراکندگی آن‌ها، جغرافیای زیستی را تشکیل می‌دهد. از میان این موجودات تعدادی آسیب‌پذیر، گروهی در خطر انقراض و بخشی در آستانه انقراض قرار دارند.

کشور ایران به دلیل تضادهای گسترده اقلیمی، پیشینه تاریخی زیستی و نیز توان بالای گونه‌زایی زیستگاه‌های مساعدی را جهت استقرار گونه‌های متنوع گیاهی و جانوری پدید آورده است و وجود مناطقی مانند مناطق خزری، کویری، کوهستانی و گرمسیری حاشیه خلیج‌فارس زیستگاه‌های متنوعی را فراهم آورده است که به‌نوبه خود بر تنوع زیستی ایران افزوده است.

۲-۲- آشنایی با اقلیم استان مازندران

مازندران استانی در شمال ایران و در کرانه‌های جنوبی دریای خزر می‌باشد که ۲۳،۷۵۶ کیلومتر مربع مساحت دارد. مرکز این استان شهر ساری است. قله دماوند مرتفع‌ترین قله ایران در مازندران و در

Archive of SID

www.SID.ir

شهرستان آمل قرار دارد. طبیعت استان مازندران تحت تأثیر عرض جغرافیایی، سلسله جبال البرز، ارتفاع از سطح دریا، دوری و نزدیکی به دریا، بیابان‌های جنوبی ترکمنستان، وزش بادهای محلی و ناحیه‌ای و پوشش گیاهی و جنگلی قرار دارد. به همین جهت آب و هوای مازندران در کانون‌های مختلف جغرافیایی متفاوت و گوناگون است و انواع آن عبارتند از: آب و هوای معتدل خزری، که تابستان‌های گرم و مرطوب و زمستان‌های معتدل و مرطوب دارد، آب و هوای معتدل کوهستانی، که زمستان‌های سرد با یخبندان و تابستان‌های معتدل و کوتاه دارد. آب و هوای سرد کوهستانی، که یخبندان‌های طولانی و زمستان‌های سرد و تابستان‌های کوتاه و خنک دارد. ریزش‌های جوی نواحی کوهستانی غالباً به‌صورت برف است که تا اواسط دوره گرما نیز دوام می‌آورد.

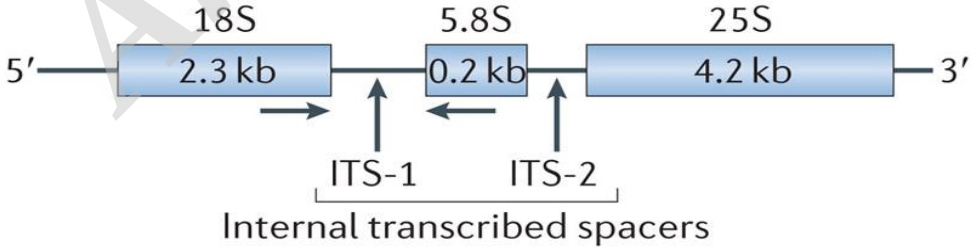
جنگل‌های مازندران به‌واسطه نزدیکی به دریا رطوبت بالایی دارد که این شرایط رطوبتی به همراه سایر عوامل رویشگاهی و جغرافیایی متنوع، بستر مناسبی را برای رشد قارچ‌ها فراهم می‌کنند و ممکن است به دلیل رطوبت هوا باشد (Lindhe *et al.*, 2004) البته برای روابط اکولوژیکی بسیاری از قارچ‌ها و ظهورشان در یک اکوسیستم، نیازمند به شرایط اقلیمی، بارش خاص و آب قابل دسترس است تا قارچ‌ها بتوانند خود را نشان بدهند و در ترکیب جوامع خود قرار بگیرند (Newbound *et al.*, 2010). بر اساس تحقیقی که توسط عبیاوی و همکاران (۱۳۸۵) در جنگل خیرود نوشهر صورت گرفت، مشخص شد که بین فراوانی قارچ‌های ماکروسکوپی و عوامل فیزیوگرافی (ارتفاع از سطح دریا، شیب، جهت دامنه) ارتباط معنی داری وجود دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۳- سیر تکاملی شناسایی گونه‌های قارچ‌های ماکروسکوپی

با پیشرفت در ژنتیک مولکولی، روش‌های متعارف و تکنیک‌های مولکولی غیر PCR (مانند ایزوزایم ها و RFLP) برای شناسایی قارچ‌ها، جای خود را به روش‌های شناسایی مبتنی بر DNA داده‌اند (Pushpa *et al.*, 2012). علاوه بر این، روش‌های مبتنی بر PCR مانند RAPD، AFLP، SSR، ISSR، خود با روش‌های بارکدینگ DNA جایگزین شده‌اند. بارکدینگ DNA با توالی‌های ۵۰۰ تا ۸۰۰ بازی تعریف می‌شود. یک توالی بارکد DNA در حالت ایده آل، ثابت و منحصر به یک گونه است (Schoch *et al.*, 2012). در حال حاضر، بارکدهای DNA ریبوزومی به‌عنوان ابزار کارآمد برای طبقه‌بندی قارچ‌ها پذیرفته شده‌اند. سیسترون rRNA هسته‌ای یوکاریوتی شامل زیر واحدهای ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S است که بیشتر از طریق فرایندهای پسا نسخه‌برداری (posttranscription) ساخته می‌شود. دو منطقه جداکننده داخلی در این سیسترون وجود دارد که همراه با ژن ۵/۸S معمولاً به عنوان مناطق ITS شناخته می‌شوند (تصویر ۲-۱). در میان مناطق سیسترون ریبوزومی، ITS دارای بیشترین احتمال شناسایی موفقیت آمیز برای بیشترین گونه‌های قارچی است (Schoch *et al.*, 2012).



تصویر ۲-۱: ترتیب ژن‌های **rRNA** در قارچ‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

علاوه بر بارکدهای DNA ریبوزومی، اخیراً ژن‌های کدگذاری کننده پروتئین به‌طور گسترده‌ای برای آنالیز پلی‌ژنتیک قارچ‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. چندین ژن کد کننده پروتئین ممکن است قابلیت بارکد قارچی داشته باشند، از جمله translation elongation factor 1-α (برای *Fusarium*) ، β-tubulin (برای *Penicillium*)، بزرگ‌ترین زیر واحد RNA پلیمراز II (RPB1) (برای *Basidiomycota*، *Zygomycota* و *Microsporidia*) و ژن کدگذاری پروتئین نگهداری مینی کروموزوم (برای *Ascomycota*). علاوه بر این، قطعه cytochrome oxidase I (COXI) برای بارکد DNA جهت طبقه‌بندی قارچی (مخصوصاً برای *Penicillium*) مورداستفاده قرار گرفته‌است (Vialle *et al*., 2009).

نشانگرهای ITS معمولاً برای شناسایی قارچ‌های وحشی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند (حیدریان و حاتمیان زارمی، ۱۳۹۵; Das *et al*., 2013). مطالعه مقایسه‌ای از نشانگرهای SSU، ITS، RPB1 و RPB2، نشان داد که ITS بارکد دقیق‌تری برای شناسایی قارچ‌های خوراکی وحشی بود (Khaund, 2014). با این حال، گزارش‌های متعددی وجود دارد که پتانسیل بارکدهای دیگر را برای شناسایی قارچ کلاهک دار نشان می‌دهد. اثبات شده است که قطعه COXI در چندین گونه قارچ *Ascomycota* و *Basidiomycota*، به‌ویژه در *A. bisporus*، بسیار مؤثرتر از ITS است (Barroso *et al*., 2011; Vialle *et al*., 2009). یافته‌های یک مطالعه دیگر نشان داد که قطعه COXI و ITS به‌طور مشابه به عنوان بارکد در میان نسبت‌های کوچک *Agaricomycotina* عمل می‌کنند. با این حال، در یک رده نزدیک، COXI نسبت به ITS در تشخیص تمام نمونه‌ها موفق نبود (Dentinger *et al*., 2011). تحقیق بر روی گونه‌های *Agaricus* وحشی ایرانی نیز نشان داده‌است که مناطق ITS و Intergenic spacer (IGS) بین ژنوتیپ‌های یک گونه یکسان هستند ولی بین گونه‌های مختلف متفاوتند. برعکس، نشانگرهای ISSR به‌اندازه کافی برای شناسایی پلی‌مورفیسم در میان ژنوتیپ های نزدیک از یک گونه *Agaricus* موفق بودند

Archive of SID

www.SID.ir

(Malekzadeh *et al*., 2014). مطالعه دیگری نشان داد که یکپارچگی توالی‌های IGS1 و ITS باعث تمایز ژنتیکی بهتر بین گونه‌های *Pleurotus* و درون آن‌ها می‌شود (Avin *et al*., 2014).

۲-۴- جمع آوری و ثبت گونه‌های قارچی ماکروسکوپی در استان‌های ایران

بیش از ۱۵۷ سال از انجام نخستین مطالعات در زمینه قارچ‌های کلاهک‌دار در ایران توسط بوهس (Buhse, 1860) می‌گذرد. هرچند طی این مدت، گزارش‌های متعددی از وجود این دسته از قارچ‌ها در مناطق مختلف ایران به ثبت رسیده‌است (Ershad, 1995).

اکثر تحقیقات انجام شده روی جمع آوری قارچ‌های ماکروسکوپی، مربوط به استان مازندران می باشد که این امر حاکی از شرایط ویژه این استان به عنوان زیستگاه مناسب برای قارچ‌های مختلف است.

جنس *Clavaria* و *Ramaria* از جنگل خیرودکنار در منطقه جنوب نوشهر شناسایی شد (بهرام و همکاران، ۱۳۸۷). موسی زاده و همکاران (۱۳۸۱)، بزرگ‌ترین قارچ خوراکی دارای خاصیت دارویی با نام علمی *Langerinannia gigantean* از خانواده Gasteromycetes را در منطقه چمستان نور، شناسایی کردند. ۴ گونه قارچ آسکومیست از جنگل" واز" واقع در چمستان ثبت گردید که عبارتند از: *Bisporella citrina* (Batschex. Fr) Korf & Carpenter، *Ascocoryne cylichnium* (Tul.) Korf، *Neobulgaria pura* (Fr.) Petrak و *Chlorciboria aeruginascens* (Nyl.) Karst. (ذکایی و موسی زاده، ۱۳۸۳).

طی بررسی‌هایی که در مناطق خیرود کنار و نیرنگ انجام شد، ۱۴ گونه برای اولین بار برای ایران گزارش شد که عبارتند از: گونه‌های جنس *Amanita* (*A. ceciliae*، *A. aspera*، *A. crocea* و *A. caesarea*)، *Cortinarius* (*C. vibratilis* و *C. variecolor*)، *Aureoboletus gentilis*، *Boletus queleti*، *Psathyrella*، *Ramaria botrytis*، *Rickenella fibula*، *Russula torulosa*، *Entoloma dichroum*

Archive of SID

www.SID.ir

olympiana و *Lyophyllum decasters* (بهرام، ۱۳۸۵). ذکایی و گرانیان (۱۳۸۷) ۹ گونه از آسکومیست‌های ماکروسکوپی جنگل شهید زارع و سیاه رودبار را شناسایی کردند. این گونه‌ها مربوط به جنس‌های *Bisporella*، *Peziza*، *Xylaria*، *Hymenoscyphus*، *Helvella*، *Tarzetta* و *Lasiosphaeria* می‌باشند. علی نژاد (۱۳۸۷) قارچ‌های ماکروسکوپی دارویی جنگل‌های مازندران را مورد بررسی قرار داد که منجر به شناسایی ۱۰ نمونه آسکومیست، ۹ نمونه ازگاستورومسیت و مابقی متعلق به گروه‌های متنوعی از قارچ‌های تیغه‌ای، منفذ دار ،ژله‌ای و یا مرجانی بود. براساس منابع تاکسونومیکی جدید، این گونه‌ها متعلق به ۱۰۴ جنس، ۵۱ خانواده، ۱۴ راسته می‌باشد. از میان این نمونه‌ها، ۲۲۱ گونه با توجه به منابع موجود، استفاده دارویی دارند.

برهانی و همکاران (۲۰۱۰) حدود ۱۰۰ گونه قارچ ماکروسکوپی جمع‌آوری کردند که ۱۱ گونه به‌عنوان گونه‌های جدید در ایران، ۴۱ گونه به‌عنوان گونه‌های جدید در منطقه مازندران و ۲۴ گونه به‌عنوان گونه‌های جدید موجود بر روی درختان راش ایران ثبت گردید. به‌طورکلی، این گونه‌های متعلق به ۵۷ جنس بودند. آقاجانی و همکاران (۱۳۹۲) به منظور بررسی فاکتورهای مؤثر رویشگاهی بر فراوانی قارچ‌های ماکروسکوپی خاک‌زی از شبکه عصبی مصنوعی استفاده کردند که نتایج تحقیق نشان داد، شبکه عصبی مصنوعی قابلیت خوبی در کلاسه‌بندی فراوانی قارچ‌های ماکروسکوپی دارد. ۲۳۱ نمونه قارچ ماکروسکوپی از روی درختان بلندمازو و ممرز جمع‌آوری گردید، که ۱۱۲ نمونه آن‌ها مربوط به قارچ‌های‌چوب‌زی بودند. تحقیقات آصف (۱۳۸۶) حاکی از وجود گونه‌هایی از جنس *Cortinarius* از منطقه ارسباران آذربایجان شرقی می‌باشد. چهار گونه متعلق به جنس *Cortinarius* به اسامی *C. arvinaceus*، *C. causticus*، *C. erumpens* و *C. pluviorum*، برای نخستین بار از ایران گزارش گردید (Asef & Tavanaei, 2004). ۹

Archive of SID

www.SID.ir

گونه از قارچ‌های بولت[8]، متعلق به سه جنس *Boletus* ، *Leccinum* و *Xerocomus* شناسایی شد که پنج گونه معرفی‌شده شامل *B. edulis* ، *B. erythropus*، *B. fechtneri*، *B. fragrans* و *X. ferrugineus* برای نخستین بار از ایران معرفی شده‌اند (آصف، ۱۳۸۷).

در ادامه معرفی قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه ارسباران، شش گونه متعلق به جنس *Cortinarius* به اسامی *C. fluryi* ،*C. paracephalixus*، *C. pseudonapus*، *C. subvalidus*،*C. sublubricus* و *C. vespertinus* برای نخستین بار از ایران گزارش می‌گردند (Asef, 2009).در گزارشی دیگر، هفت گونه از قارچ‌های تیره Russulacea متعلق به دو جنس *Russula* و *Lactarius* که از جنگل‌های ارسباران جمع‌آوری و شناسایی شدند. سه گونه از هفت گونه معرفی شده شامل *L. serifluus*، *R. lilacea* و *R. sororia* برای نخستین بار از ایران معرفی می‌گردند (آصف، ۱۳۹۰). در استان گیلان نمونه‌هایی از یک اکتومیکوریز جالب توجه (*Hydnellum peckii* Banke) از روی خاک در مجاورت سوزنی برگان، جمع آوری و شناسایی گردید (آصف، ۱۳۸۷).

حسینی و همکاران (۱۳۸۸)، ۸ گونه قارچ دارویی و سمی را در استان لرستان شناسایی کردند که شامل گونه *Collybia maculate* و *Coprinus atramentarius*، سه گونه از جنس *Boletus* شامل *B. luridus*، *B. felleus* و *B. satana*، دو گونه از جنس *Lactarius*، شامل *L. vellereus* و *L. piperatus* و گونه *Hypholoma capnoides* می‌باشد.

[8]bolets

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۵- مراکز جمع‌آوری و ثبت گونه‌های قارچی ماکروسکوپی در ایران

تنها مرکز جمع‌آوری و ثبت گونه‌های قارچی در ایران، مجموعه مرجع قارچ‌های وزارت جهاد کشاورزی بوده که شامل دو بخش قارچ‌های غیر زنده (هرباریوم) و قارچ‌های زنده (کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران) می‌باشد.

الف) هرباریوم

هم‌اکنون در مجموعه هرباریوم، ۱۶۶۰۷ نمونه از قارچ‌ها، شبه قارچ‌ها و گلسنگ‌ها نگهداری می‌شود که این نمونه‌ها به ۹۰ راسته، ۱۰۲۰ جنس و ۴۳۳۵ گونه (شامل ۲۷۴۵ گونه از ایران) تعلق دارند. تا به امروز از حدود ۳۵۰۰ گونه قارچ ایران، بیش از ۷۵ درصد آن در مجموعه قارچ‌های وزارت جهاد کشاورزی جای گرفته است.

ب) کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران

مجموعه قارچ‌های زنده وزارت جهاد کشاورزی با دارا بودن تعداد ۲۱۰۷ کشت زنده قارچ که ۱۵۶۳ کشت آن از ایران جمع‌آوری شده در بردارنده جدایه‌هایی ارزشمند به‌ویژه جدایه‌های بومی از قارچ‌های مهم درگیاهپزشکی، شامل قارچ‌های بیمارگر روی گیاهان و قارچ‌های توکسین‌زا، قارچ‌های بیمارگر حشرات و دیگر بندپایان و همچنین قارچ‌های بیمارگر نماتدها می‌باشد. هدف اصلی کلکسیون قارچ‌های زنده، نگهداری استرین‌ها بدون بروز هر گونه تغییرات ریخت‌شناسی، فیزیولوژیکی یا ژنتیکی در آن‌ها جهت استفاده در مطالعات آتی می‌باشد (عسگری و زارع، ۱۳۹۴).

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۶- مراکز و پروژه‌های جمع‌آوری و ثبت قارچ‌های ماکروسکوپی در کشورهای دیگر

۲-۶-۱- فونگاریوم کیو(KW's Fungarium)

فونگاریوم کیو به‌عنوان کلکسیون ملی قارچ بریتانیا واقع در هرباریوم باغ گیاهشناسی رویال Kew در لندن، بزرگ‌ترین و یکی از قدیمی‌ترین کلکسیون‌ها بوده و همچنین به لحاظ علمی بیشترین اهمیت را در دنیا دارد. حدود ۶۰۰۰۰ گونه توسط این مجموعه نگهداری می‌شود که معادل ۶۰ درصد قارچ‌های شناخته‌شده دنیا است و هر ساله ۴۵۰۰ نمونه جدید توسط فونگاریوم دریافت می‌شود (Dentinger *et al.*, 2015).

۲-۶-۲- هرباریم دانشگاه بریتیش کلمبیا (University of British Columbia Herbarium, UBC)

این هرباریوم بزرگ‌ترین مجموعه در کانادا بوده و شامل بیش از نیم میلیون نمونه گیاهی از سراسر دنیاست. این هرباریوم شامل ۵ کلکسیون بزرگ گیاهان آوندی[9] بریوفیت ها[10] گیاهان بدون برگ و ساقه[11] گلسنگ‌ها و قارچ‌ها است. حدود ۱۵۰۰۰ نمونه قارچ در این مرکز نگهداری می‌شود (Tylor & Eric., 2013; Godwin, 2013).

[1]vascular plant
[2]bryophytes
[11]algae

Archive of SID
www.SID.ir

۲-۶-۳- بانک منبع قارچ‌های کلاهک دار کشور کره جنوبی (Korea Mushroom Resource Bank KMRB)

بانک منبع قارچ‌های کلاهک دار به‌عنوان بانک منبع تحقیقات ملی در سال ۲۰۱۵ توسط وزارت علوم، فناوری اطلاعات و برنامه‌ریزی کشور کره جنوبی شروع به کار کرد و یکی از زیرمجموعه‌های مرکز منابع تحقیقاتی ملی آن کشور (Korea National Research Resources Center [KNRRC]) است. هدف KMRB، تأمین منابع بیولوژیکی مهم، قارچ‌های کلاهک دار، منابع اولیه و مواد جدید مانند نمونه‌های خشک‌شده، کشت‌ها و ذخایر ژنتیکی (DNA) است (Sunhee *et al*., 2016).

۲-۶-۴- قارچ‌های کالیفرنیا (The Fungi of California)

طرح‌های تحقیقی زیادی به‌منظور جمع‌آوری و شناسایی قارچ‌های ماکروسکوپی کالیفرنیا انجام می‌گردد. نتایج این طرح‌ها و قارچ‌های ماکروسکوپی جمع‌آوری شده، همراه با عکس و مشخصات آن‌ها در سایتی با نام قارچ‌های کالیفرنیا ثبت و ضبط می‌گردد. هدف از انجام این طرح‌ها و ثبت آن‌ها، شرح تمامی گونه‌های قارچ‌های ماکروسکوپی موجود در کالیفرنیا و در اختیار گذاشتن مشخصات، عکس‌ها و اطلاعات مربوط به هر گونه است. بیش از ۳۰۰۰ تا ۴۰۰۰ گونه قارچ‌های گوشتی در کالیفرنیا وجود دارد (Desjardin *et al*., 2015).

۲-۶-۵- قارچ‌های کلرادو (COLORADO MUSHROOM)

مجموعه کاملی از نمونه قارچ‌های کلرادو، در هرباریوم باغ گیاهشناسی Denver نگهداری می‌شود. بالغ بر ۱۷۰۰ گونه و ۲۵۰ جنس و نزدیک به ۲۰۰۰۰ نمونه خشک‌شده در این مجموعه قرار دارد (,Evenson

Archive of SID
www.SID.ir

1997). مشخصات کامل ۲۲۰ گونه قارچ کلاهک دار مربوط به کلرادو و کوه‌های راکی توسط اونسون گزارش شده‌است (Evenson & Denver Botanic Garden, 2015).

۲-۶-۶- کلکسیون ATCC آمریکا (American Type Culture Collection)

ATCC برجسته‌ترین مرکز مواد بیولوژیکی دنیا (کلکسیون کشت و توزیع)، واقع در ایالات‌متحده آمریکا است که کار جمع‌آوری، ذخیره‌سازی و توزیع میکروارگانیزم‌ها و لاین‌های سلولی مرجع استاندارد را بر عهده دارد. این مجموعه حاوی ۷۵۰۰ گونه مخمر و قارچ می‌باشد (Berns *et al.*, 1996).

۲-۶-۷- قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه دنیزلی ترکیه

طی سال‌های ۲۰۰۶- ۲۰۰۵، طرح جمع‌آوری قارچ‌های ماکروسکوپی توسط یکی از اعضای دپارتمان بیولوژی دانشکده علم و هنر دانشگاه نوسهیر ترکیه، انجام شد که هدف از این طرح، شناسایی گونه‌های مختلف و جدید قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه‌ای واقع در کشور ترکیه بود. در مجموع ۱۲۵ آرایه متعلق به ۷۰ جنس، ۴۰ خانواده (تیره) و ۲ رده شناسایی شد که ۱۹ آرایه متعلق به ردهٔ آسکومیست‌ها و ۱۰۶ آرایه متعلق به ردهٔ بازیدیومیست‌ها بودند (Turkoglu, 2008).

۲-۶-۸- قارچ‌های ماکروسکوپی منطقه Black Hills ایالت داکوتای جنوبی (آمریکا)

بین سال‌های ۲۰۰۲- ۱۹۹۸، طرحی تحقیقی به‌منظور جمع‌آوری و شناسایی و مستند کردن گونه‌های قارچ‌های ماکروسکوپی موجود در منطقه Black Hills ایالت داکوتای جنوبی (آمریکا) و همچنین

Archive of SID
www.SID.ir

کوهستان‌های اطراف رودخانه بر (Bear) ایالت وایومینگ (آمریکا) انجام شد. ۲۶۰ گونه قارچ ماکروسکوپی از ۹۵ مکان در مناطق مذکور جمع‌آوری گردید که ۲۳۹ گونه به‌عنوان گونه‌های جدید در منطقه ارائه شدند (Gabel *et al*., 2004).

۲-۶-۹- قارچ‌های ماکروسکوپی کاستاریکا

در انستیتو ملی تنوع زیستی کاستاریکا، ۵۷۲۰ داده مربوط به قارچ‌های ماکروسکوپی در هرباریوم آن جمع‌آوری و ثبت گردیده است که متعلق به ۷۰ خانواده (تیره)، ۲۵۴ جنس و ۳۹۰ گونه قارچ می‌باشد (Soto, 2015).

Archive of SID

www.SID.ir

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- نمونه‌برداری

۳-۱-۱- مناطق و زمان‌های نمونه‌برداری

بر طبق پیش بینی در پروپوزال این تحقیق، نمونه‌برداری‌های قارچ‌های کلاهک‌دار در چندین منطقه از استان مازندران در طی سال‌های ۱۳۹۶-۱۳۹۴ انجام شد (شکل ۳-۱). تجربیات قبلی محققین این پژوهش نشان داده است که فصل‌های بهار و پاییز (پس از بارندگی و در طی روزهای آفتابی پس از آن) بهترین زمان برای ظهور اندام بارده قارچ‌های کلاهک دار در شمال کشور هستند. از سویی، با توجه به تغییرات دما و میزان بارش در طول هر فصل، نوع قارچ‌های ظاهرشده نیز متفاوت است. لذا هر منطقه حداقل ۲ بار مورد نمونه‌برداری قرار گرفت و همچنین یک نمونه‌برداری جامع در فصل بهار و همچنین پاییز انجام شد.

شکل ۳-۱- نقشه استان مازندران جهت انتخاب مکان‌های نمونه‌برداری

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۱-۲- ثبت مشخصات و شناسایی تخمینی نمونه‌ها در هنگام جمع‌آوری

اطلاعات مربوط به هر جدایه شامل مشخصات نمونه‌ها، مشخصات جغرافیایی معمول در هر نقطه نمونه‌برداری (شامل طول و عرض جغرافیایی، ارتفاع از سطح دریا و غیره)، تغییرات رنگ و بو، نوع حلقه و اطلاعاتی درباره‌ی نحوه‌ی رشد (منفرد، گروهی) و اطلاعات رویشگاه (خاک و گیاهان)، تغییر رنگ بافت قارچ با ایجاد خراش یا برش، ساختار حلقه، بو یا عطر و واکنش شافر ثبت شد.

۳-۱-۲-۱- عکس‌برداری از نمونه‌ها

به دلیل تغییر شکل بسیاری از ساختارهای مهم تاکسونومیکی پس از انتقال به آزمایشگاه و یا خشک شدن، تهیه عکس از بخش‌های مهم قارچ در زمان جمع‌آوری در مطالعه قارچ‌های ماکروسکوپی بسیار مهم است. لذا در هر نقطه از نمونه‌برداری، تصاویری از رویشگاه، میزبان، کلاهک پایه، حلقه، بقایای پرده جزئی و عمومی، ریزوئیدها، برش عرضی، تغییر رنگ بعد از خراش یا استفاده از واکنش‌گرهای شیمیایی و سایر خصوصیات منحصر به فرد به همراه نشانگر اندازه تهیه شد.

۳-۱-۲-۲- آزمون‌های شیمیایی

واکنش‌های تغییر رنگ و بوی نمونه‌های جمع آوری شده در طی چند آزمون شیمیایی مختلف شامل واکنش هیدروکسید پتاسیم، آزمون تشخیص بو، واکنش شافر و آزمون خراش، سنجیده و ثبت شد. واکنش هیدروکسید پتاسیم با استفاده از محلول هیدروکسیدپتاسیم[12] ۱۰٪ انجام شد. برای اینکار، یک قطره از محلول هیدروکسید پتاسیم روی لبه‌ی کلاهک یا پایه ریخته شده و تغییر رنگ و همچنین سرعت تغییر

[12] KOH

Archive of SID

www.SID.ir

رنگ ثبت شد. جهت آزمون ثبت تشخیص بو، پس از شکستن یا نصف کردن کلاهک اقدام به ثبت بو با حالت‌های بدون بو (غیر قابل تشخیص یا متغیر)، بوی بادام، بادام تلخ، انیسون، بنزالدهید یا بنزوییک اسید، فنول، یودین، یودوفرم، کاربولیک اسید، جوهر هندی[۱۳]، دارو و یا غیره شد. واکنش شافر با کمک آنیلین و نیتریک اسید مورد بررسی قرار گرفت. واکنش شافر از طریق کشیدن دو خط با دو میله شیشه‌ای که یکی در آنیلین و دیگری در نیتریک اسید فرو برده شده است انجام شد. واکنش در صورتی مثبت است که در محل برخورد این دو خط، رنگ نارنجی یا قرمز روشن سریعاً ظاهر شود و اگر تغییر رنگ مشاهده نشود و یا رسوب سفید، آجری تا نارنجی-آجری بعد از چند دقیقه یا چند روز ظاهر شود، واکنش منفی است. همچنین با کمک چاقوی نمونه‌برداری، آزمون خراش انجام گردید. بدین منظور، روی یک یا چند نمونه جوان در محل لبه‌ی کلاهک و انتهای پایه خراشی ایجاد شد. تغییر رنگ حاصل از خراش و همچنین مدت زمان واکنش تغییر رنگ (بلافاصله بعد از خراش، ۱۰ ثانیه بعد از خراش و چند ساعت بعد از خراش) مشاهده و ثبت شد (Parra, 2008).

۳-۱-۲-۳- برش طولی

به کمک چاقوی نمونه‌برداری برش طولی از قارچ به نحوی تهیه شد که چاقو کاملاً از وسط ساقه عبور کند. پس از برش و ثبت تصویر، وضعیت توپر و یا توخالی بودن ساقه و بافت آن بررسی شد.

[13] Indian Ink

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۲- کشت بافت و خالص‌سازی اولیه نمونه‌ها

در اولین فرصت پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه نزدیک منطقه نمونه‌برداری، کشت بافت اولیه اندام باردهی روی حداقل دو نوع محیط کشت (عصاره کم پوست آگار[۱۴] و عصاره مالت آگار[۱۵]) انجام شد (Stamets and Chilton, 1983). در شرایط نمونه‌برداری، فرصتی برای تست بهترین محیط کشت و بررسی مشخصات رشدی میسلیوم نبود، لذا این کشت بافت اولیه بر اساس دو نوع محیط صرفاً با هدف تولید میسلیوم زنده در کمترین زمان ممکن برای انتقال به آزمایشگاه مجهزتر در مشهد یا تهران انجام گرفت. آزمایشات دقیق تعیین بهترین محیط کشت و بررسی مشخصات رشدی میسلیوم، در مراحل نهایی کشت و خالص‌سازی انجام گرفت.

Archive of SID

Compost Extract Agar[۱۴]
Malt Extract Agar [۱۵]

www.SID.ir

۳-۲-۱- تهیه محیط کشت

- محیط عصاره کمپوست آگار

مقدار ۱۰۰ تا ۲۰۰ گرم کمپوست (کمپوست مخصوص تولید قارچ دکمه‌ای) در یک و نیم لیتر آب مقطر به مدت حداقل ۲۰ دقیقه در حرارت ملایم جوشانده شد. پس از عبور از پارچه صافی، مقادیر ۲۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر از محلول جوشانده شده‌ی کمپوست اضافه و حل شد. به‌منظور جلوگیری از رشد باکتری، به نسبت ۲۰۰ پی‌پی‌ام کلرامفنیکل به محیط کشت اضافه شد. محلول بدست آمده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک بار به مدت بیست دقیقه اتوکلاو شد. محیط اتوکلاو شده با رعایت شرایط استاندارد زیر هود بیولوژیک سترون و سپس در پتری‌دیش‌های گاما استریل ریخته شد و پس از سفت شدن تا زمان استفاده در یخچال تحت شرایط دمایی چهار درجه سلسیوس نگهداری شد (Stamets and Chilton, 1983).

- محیط عصاره مالت آگار

مقدار ۲۰ گرم مالت و ۲۰ گرم گلوکز با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد. سپس به نسبت ۲۰۰ پی‌پی‌ام کلرامفنیکل به محلول بدست آمده اضافه شد. پس از سترون شدن تحت تأثیر شرایط اتوکلاو، محیط کشت به پتری‌دیش‌های گاما استریل منتقل شد. در نهایت پس از سفت شدن، درون یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (Stamets and Chilton, 1983).

۳-۲-۲- کشت بافت اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده

از کلاهک‌های جوان برشی کم عمق در سطح کلاهک یا پایه ایجاد شد و با کمک دست در جهت طولی قارچ به دونیم تقسیم گردید. سپس با کمک اسکالپل یا سوزن سترون شده روی شعله چراغ الکلی و

Archive of SID
www.SID.ir

خنک شده چند تکه از بافت مرکزی بین پایه و کلاهک برداشته و روی محیط کشت‌های مختلف (بر اساس توضیحاتی که در بند ۳-۲-۱ و ۳-۲-۲ بیان شد) گذاشته شد و در فواصل دو، پنج و ده روز اقدام به ارزیابی رشد کشت‌ها و تهیه واکشت‌ها شد (Stamets and Chilton, 1983).

۳-۲-۳- خالص‌سازی اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده

در این پژوهش، خالص‌سازی اولیه نمونه‌های قارچ جمع آوری شده با استفاده از شاخص‌هایی همچون فرم و سرعت رشد شعاعی میسلیوم انجام شد. هدف از خالص‌سازی، تمایز میسلیوم گونه قارچ کلاهک‌دار مورد نظر از سایر قارچ‌های کلاهک‌دار و همچنین تمایز آن از سایر قارچ‌های رشته‌ای و احتمالاً پاتوژن بود. در برخی موارد جهت اطمینان از عدم وجود اسپور سایر قارچ‌های میکروسکوپی، مبادرت به تهیه اسلاید میکروسکوپی از بازیدیوسپورها و در موارد دیگر اقدام به تهیه نمونه نوک هیف شد.

۳-۲-۴- نگهداری نمونه‌های زنده خالص شده

به دلیل عدم داشتن اطلاعات شناخته شده در مورد قارچ‌های دارویی جمع‌آوری‌شده، بیشتر نمونه‌های اولیه پس از کشت بافت و انجام مراحل خالص‌سازی در دمای حدود ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند، چراکه این دما یک بازه دمایی مناسب برای رشد رویشی تقریباً بیشتر گونه‌های قارچ‌های کلاهک‌دار می‌باشد.

۳-۲-۵- خشک‌کردن نمونه‌ها برای کاربردهای مختلف

علاوه بر کشت بافت و خالص‌سازی میسلیوم برای هر نمونه از قارچ جمع‌آوری شده، نمونه‌هایی از هر قارچ نیز برای خشک کردن انتخاب شد (به‌منظور استفاده در شناسایی بر اساس ریخت‌شناسی و استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

هرباریومی). در صورت دسترسی به آزمایشگاه (در منطقه جمع‌آوری)، نمونه‌ها در آون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد حداقل به مدت دو روز قرار داده شدند. در صورت عدم دسترسی به آزمایشگاه، در معرض تابش نور خورشید، روی شوفاژ یا بخاری اقدام به خشک‌کردن نمونه‌ها شد. در برخی از موارد نمونه‌ها برای خشک شدن در الکل قرار داده شدند (شکل ۳-۲). در صورت وجود آفات، نمونه در دمای بالاتر و در مدت زمان سریعتری خشک گردیدند. همچنین از هر قارچ کلاهک‌دار، حداقل یک نمونه جهت نگهداری بازیدیوسپورهای زنده قارچ در یخچال نگهداری و سپس در جریان هوا خشک شد (شکل ۳-۳).

نمونه‌های خشک متعاقباً در بسته‌های کاغذی قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس در کیسه‌های پلاستیکی مخصوص نگهداری شدند. همچنین به‌منظور از بین رفتن تخم آفات، نمونه‌ها در دمای کمتر از صفر درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز قرار داده شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳-۲- خشک کردن و نگهداری برخی از نمونه‌ها در الکل

شکل ۳-۳- تهیه و نگهداری نقش اسپور برخی از نمونه‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۳- شناسایی بر اساس ریخت‌شناسی نمونه خشک (پس از جمع‌آوری)

۳-۳-۱- شناسایی مبتنی بر مشاهدات میکروسکوپی

شناسایی دقیق ریخت‌شناسی با استفاده از صفات میکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده خشک در آزمایشگاه انجام گرفت. مشاهدات میکروسکوپی (با استفاده از میکروسکوپ OLYMPUS BX51) با بزرگنمایی ۱۰ عدسی شیئی بر روی بازیدیوسپور، بازیدیوم، سیستیدیوم‌ها و پیلی‌پلیس‌ها انجام و ثبت گردید. برای بررسی جزئیات ریخت‌شناسی بازیدیوم‌ها و تیغه‌های اسپور زیر کلاهک، قسمت‌های مربوطه با کمک یک تیغ بریده شده و روی لام حاوی هیدروکسید سدیم ۵٪ آمونیاکی قرمزگونه قرار داده شدند. جهت تهیه‌ی اسلاید میکروسکوپی از بازیدیوسپورها، تکه‌ای از تیغه‌ی اسپور زیر کلاهک قارچ (در نمونه‌های کاملاً بالغ خشک) به مدت حداقل یک تا دو دقیقه در روی لامل حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ قرار داده شد تا نرم شوند. سپس لامل روی آن قرار داده و زیر میکروسکوپ مشاهده و تصاویر ثبت و ابعاد حداقل ۳۰ عدد اسپور اندازه‌گیری شد. جهت تهیه‌ی سلاید میکروسکوپی از کیلوسیستیدیوم‌ها و بازیدیوم‌ها، تکه‌ای از بخش لبه‌ی تیغه‌ها (کیلوسیستیدها فقط در لبه‌ی تیغه‌ها وجود دارند) به مدت حداقل یک تا دو دقیقه در روی لامل حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪ قرار داده شد تا نرم شوند. سپس با کمک دستمال کاغذی بخشی از هیدروکسید پتاسیم اضافی خشک و به آن یک قطره کنگو قرمز اضافه شد. سپس به کمک تیغ یا اسکالپل تیز از لبه تیغه که حاوی کیلوسیستیدهاست برش نازکی تهیه و با کمک دستمال و

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین اضافه کردن قطره آب، رنگ اضافی حذف گردید. در انتها، با قرار دادن لامل روی نمونه و در زیر میکروسکوپ مشاهدات انجام گرفت (Kuo, 2006).

پس از تهیه اسلایدهای میکروسکوپی، به منظور اندازه گیری ابعاد بازیدیوسپورها، بازیدیوم‌ها و کیلوسیستیدیوم‌ها، از هر نمونه حدود ۳۰ بازیدیوسپور، ۱۰ بازیدیوم و ۱۰ کیلوسیستیدیم مورد استفاده قرار گرفت. سپس به کمک میکروسکوپ مجهز به مقیاس، اندازه تصاویر نمونه‌ها تهیه و با کمک نرم افزار MycoCam (Shotbolt, 2015) طول و عرض آن‌ها اندازه‌گیری شد.

۳-۳-۲- شناسایی مبتنی بر مشاهدات ماکروسکوپی

علاوه بر آنچه به‌عنوان شناسایی تخمینی اولیه در هنگام جمع‌آوری انجام شد، شناسایی ماکروسکوپی پس از جمع‌آوری و بر اساس شاخص‌هایی همچون پایه قارچ، داشتن یا نداشتن حلقه دور پایه و زیر کلاهک، شکل کلاهک و فلس‌های روی آن، محل پیدایش و محیط رشد مرتبط با آن، رنگ کلاهک و پایه انجام شد.

۳-۴- شناسایی مولکولی سویه‌ها

۳-۴-۱- استخراج DNA

پس از شناسایی بر اساس شواهد میکروسکوپی و ماکروسکوپی، سویه‌ها (جدایه‌ها) برای شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا کشت میسلیومی و استخراج DNA ژنومی انجام شد. برای استخراج DNA ژنومی، میسلیوم سویه‌های خالص‌شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت YPG[۱۶] مایع (بدون آگار) تلقیح شده و برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ °C گرماگذاری گردید. رشد میسلیوم در محیط مایع

[۱۶] محیط کشت YPG: این محیط کشت حاوی عصاره مالت، پپتون و گلوکز می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

به‌صورت چشمی بررسی شده و به اندازه یک لوپ از توده زیستی (Biomass) به یک ویال ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول لیز تهیه شده بر اساس روش بهینه‌سازی شده توسط برخی از همکاران این طرح (Saba et al., 2016) به ویال اضافه شده و بافت قارچی تا حد امکان با استفاده از میله فلزی در محلول لیز خرد گردید. سپس ۷۵ میکرولیتر محلول SDS 10% به ویال اضافه شده و به آرامی چند بار اینورت گردید. ویال برای ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۶۵ گرما دیده و سپس به فریزر $-20^{o}C$ منتقل شد. پس از ۲۰ دقیقه سرماگذاری، ۳۵۰ میکرولیتر بافر لیز به ویال اضافه شده و مجدداً در دمای ^{o}C ۶۵ برای ۲۰ دقیقه قرار گرفت. دو بار دیگر ویال طبق زمان‌های بالا گرما دیده و فریز گردید. سپس درنهایت ویال در ^{o}C ۶۵ قرار گرفت تا بافت فریز شده ذوب شود. سپس ۱۵۰ میکرولیتر بافر پتاسیم استات به ویال اضافه شده و برای ۵ ثانیه و در نهایت سرعت ورتکس شد. ویال برای ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ گرم سانتریفیوژ شده و محلول بالایی به یک ویال جدید و با دقت منتقل گردید. مجدداً سانتریفیوژ با شرایط بالا انجام شده و مجدد محلول رویی به یک ویال جدید منتقل گردید. سپس ۷۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول با دمای ^{o}C ۲۰- به ویال اضافه شده و ویال برای چند بار به آرامی سر و ته گردید. سپس برای ۶ ساعت ویال در دمای ^{o}C ۲۰- قرار داده شد. سپس ویال در سرعت ۱۴۸۰۰ و برای ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و بعد از دور ریختن محلول رویی، ۳۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شده و مجدداً در شرایط فوق الذکر سانتریفیوژ انجام شد. در نهایت محلول رویی به آرامی دور ریخته شده و برای ۱۵ دقیقه ویال در دمای ^{o}C ۳۷ خشک شد تا به آن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شود و برای انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گیرد (Saba *et al.*, 2016).

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۴-۲- کنترل کیفیت DNA استخراج شده

مقدار ۳ میکرولیتر از DNA ژنوم استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد و پس از ۵۰ دقیقه الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت، ژل موردنظر به مدت ۲۰ دقیقه با اتیدیوم برماید رنگ آمیزی و سپس کیفیت ژنوم استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۴-۳- تکثیر توالی ITS

جهت شناسایی مولکولی سویه‌های قارچ خوراکی از آنالیز شباهت توالی قطعات ITS استفاده گردید. برای تکثیر توالی ITS، از پرایمرهای مندرج در جدول ۳-۲، ترکیب واکنش ارائه‌شده در جدول ۳-۳ و برنامه تکثیر ارائه‌شده در شکل ۳-۴ استفاده شد. پرایمرها و اجزای ترکیب واکنش همگی از شرکت سیناژن خریداری‌شده و واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه Thermal cycler: Biorad MyCycler در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران انجام شد.

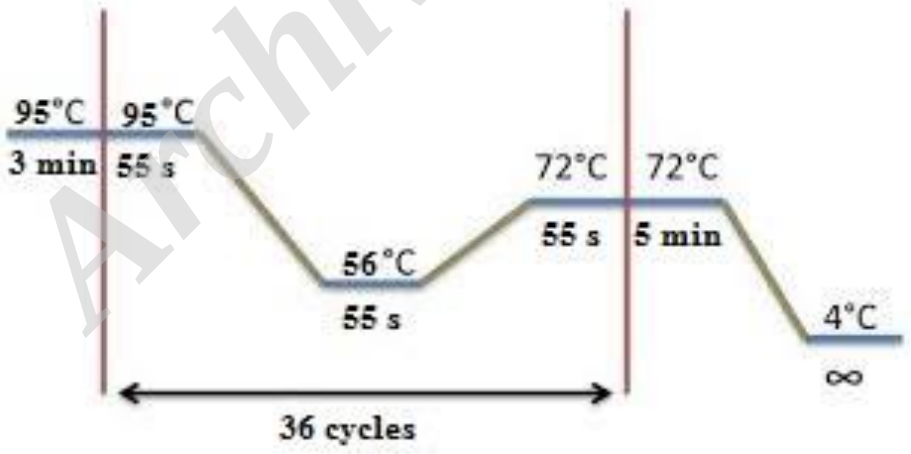
جدول ۳-۱- توالی پرایمرهای عمومی **ITS1** و **ITS4**

ردیف	نام پرایمر	توالی
۱	ITS1	5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’
۲	ITS4	5’-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3’

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳-۲- ترکیب اجزای واکنش پلیمرازی

مواد اولیه	حجم (میکرولیتر)	غلظت در محلول نهایی
بافر	۵	1X
$MgCl_2$	۵	2mM
dNTP	۱	از هر یک به میزان ۰/۵-۰/۴ میلی‌مولار
Primers	۲ از هر پرایمر	۰/۵-۰/۴ میلی‌مولار از هر پرایمر
*Taq p*olymerase	۱	۲ واحد (U) در هر ۵۰ میکرولیتر
DNA template	۰/۵	---
Distilled Water	باقیمانده حجم تا ۵۰ میکرولیتر	----
حجم نهایی	۵۰	---



شکل ۳-۴- برنامه واکنش پلیمرازی جهت تکثیر قطعه ITS.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۵- کشت و خالص سازی نهایی سویه‌های تعیین گونه شده

پس از تأیید گونه در مراحل قبل، تمامی سویه‌ها از نظر بهترین محیط کشت و تأثیر آن بر شاخص‌های رشدی میسلیوم مورد بررسی و آنالیز نهایی قرار گرفتند تا مطلوب‌ترین شرایط رشدی میسلیوم تعیین گردد. همچنین، خلوص میسلیومی در تمامی شرایط مورد آزمایش کنترل شد. با توجه به دارا بودن اطلاعات دقیق در خصوص گونه‌ی سویه‌های مورد استفاده در این مرحله از پژوهش، اهداف این مرحله عبارت بودند از: امکان نگهداری و تجدید کشت متوالی سویه‌ها در محیط کشت مناسب خود بر حسب نیاز، امکان تکرار آزمایشات و تولید میسلیوم مرغوب از سویه‌ها در صورت لزوم در پژوهش‌های آینده و بررسی تغییرات در مورفولوژی میسلیوم قارچ‌های بومی در واکنش به محیط‌های کشت مختلف و استفاده از این اطلاعات در پژوهش‌های آتی.

۳-۵-۱- تهیه محیط کشت

با توجه به تجربیات قبلی محققین این پژوهش، ۴ محیط کشت اختصاصی قارچ‌های خوراکی-دارویی شامل PDA,CEA,YPG, MEGA مورد استفاده قرار گرفتند.

- محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar)

ترکیبات (برای یک لیتر محیط کشت): عصاره سیب زمینی، دکستروز و آگار که به‌صورت پودر آماده از مرک (Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شد. مقدار ۳۹ گرم از پودر آماده فوق در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

- محیط کشت MEGA (Malt Extract Glucose Agar)

Archive of SID
www.SID.ir

ترکیبات (برای یک لیتر محیط کشت): عصاره مالت (۲۰ گرم)، گلوکز (۲۰ گرم) و آگار (۲۰ گرم) که همگی از مرک خریداری شدند. مجموع ۶۰ گرم پودر مخلوط فوق در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

- محیط کشت YPGA (Yeast Pepton Glucose Agar)

ترکیبات (برای یک لیتر محیط کشت): عصاره مخمر (۳ گرم)، پپتون (۵ گرم)، گلوکز (۱۰ گرم) و آگار (۲۰ گرم) که همگی از مرک خریداری شدند. مجموع ۳۸ گرم پودر مخلوط فوق در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

- محیط کشت CEA (Compost Extract Agar)

ترکیبات (برای یک لیتر محیط کشت): عصاره کمپوست (۳۰۰ گرم) که به‌صورت دستی تهیه شد و همراه با ۲۰ گرم آگار (از مرک) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. برای تهیه عصاره کمپوست، ۳۰۰ گرم کمپوست تازه پاستوریزه شده (مربوط به قارچ خوراکی دکمه‌ای با فرمول کاه و کلش گندم ۶۵٪، کود مرغی ۳۳٪، کود اوره ۰/۸٪ و ملاس چغندر قند ۱/۲٪ که در طی مدت زمان حدود ۳ هفته فرآوری شده است) با یک لیتر آب مقطر جوشانده و عصاره به دست آمده پس از صاف کردن توسط کاغذ صافی، در سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. بخش رویی شفاف حاصل از سانتریفیوژ با آگار مخلوط شده بطوریکه سهم آگار ۲٪ (وزنی به حجمی؛ گرم به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر) شود.

تمامی محیط‌های کشت فوق، پس از تهیه در اتوکلاو در شرایط ۱/۵ اتمسفر، ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن، هر ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت در داخل یک پلیت ۸ سانتی‌متری گاما استریل تقسیم شد (شکل ۳-۵).

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ۳-۵- تهیه محیط کشت و توزیع آن در پتری‌دیش، عکس از آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد

Archive of SID

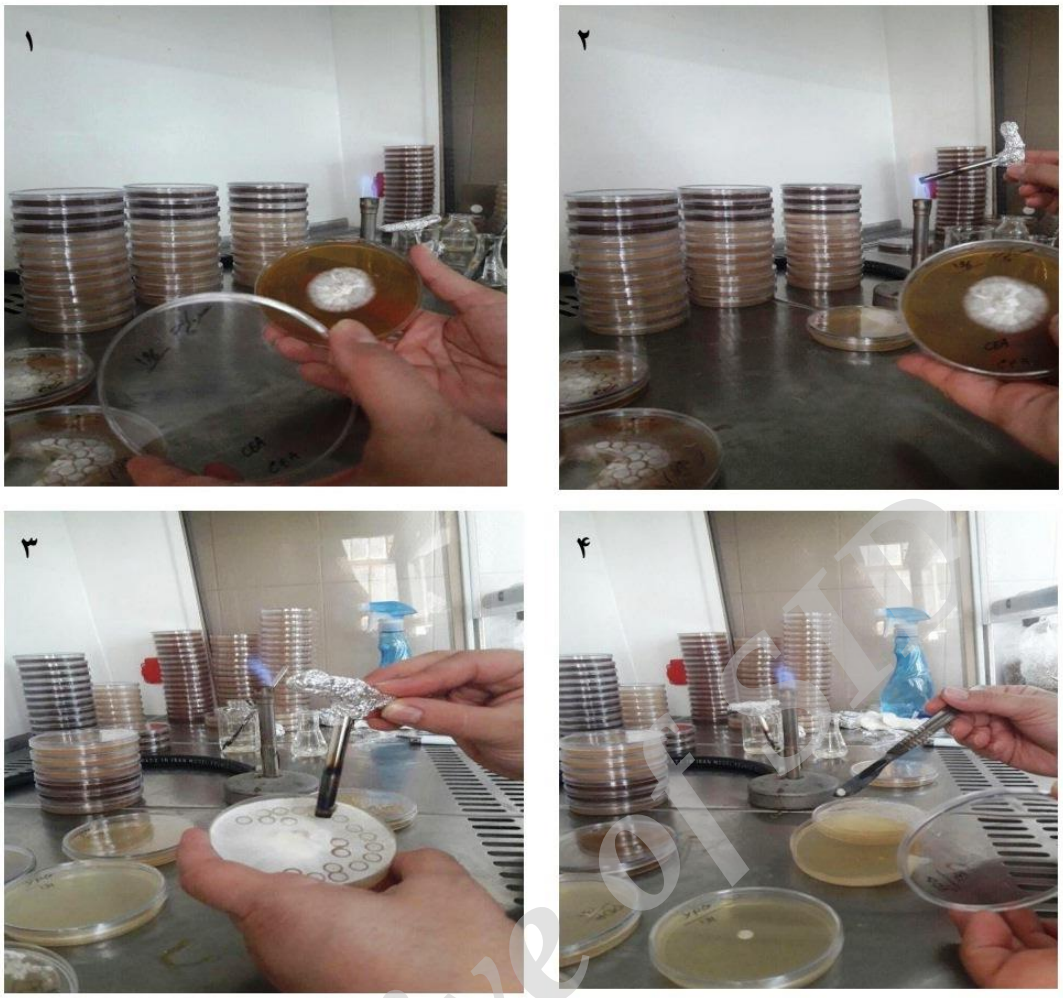
www.SID.ir

۳-۵-۲- خالص‌سازی و واکشت میسلیوم

برای حصول اطمینان از خالص بودن میسلیوم، واکشت میسلیوم‌ها در محیط‌های کشت از طریق نمونه‌برداری از انتهاترین قسمت میسلیوم (نوک هیف) بر اساس روش فارسی و پوریان‌فر (۱۳۹۰) انجام گردید. قطر نمونه میسلیومی برداشت شده از محیط کشت قدیمی (برای انتقال به محیط کشت جدید) به‌اندازه ۷ میلی‌متر بود. تمامی مراحل واکشت و خالص‌سازی میسلیوم در زیر هود استریل کلاس ۲ و استریل کردن ابزار نمونه‌برداری با کمک شعله انجام شد (شکل ۳-۶).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳-۶- انجام واکشت از نمونه‌های قارچ‌های بومی تعیین گونه شده

انواع محیط کشت برای قارچ‌های بومی در تیر-مرداد ۱۳۹۶ در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد تهیه شدند. مراحل مختلف واکشت و انتقال قطعه میسلیومی به محیط‌های کشت تازه، در تیر-مرداد ۱۳۹۶ در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد. مرحله ۱ آماده کردن یک کشت میسلیومی از جدایه قارچ بومی موردنظر، مرحله ۲ استریل کردن کورک بورر، مرحله ۳ استفاده از کورک بورر برای تولید قطعات هم اندازه نوک میسلیومی برای انتقال و مرحله ۴ انتقال قطعات نوک میسلیومی از محیط کشت قدیمی به محیط کشت جدید توسط اسکالپل استریل را نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۵-۳- بررسی مشخصات رشدی میسلیوم

کشت‌های خالص در دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بازه زمانی برای بررسی مشخصات رشدی میسلیوم برای تمامی نژادها، ۱۴ روز بود. بر اساس روش بهینه‌سازی شده قبلی محققین این پژوهش بر روی قارچ‌های بومی (Masoumi et al., 2015) مشخصات رشدی شامل سرعت رشد شعاعی میسلیوم، شکل پرگنه و رنگ پرگنه مورد مشاهده و یادداشت برداری روزانه قرار گرفتند.

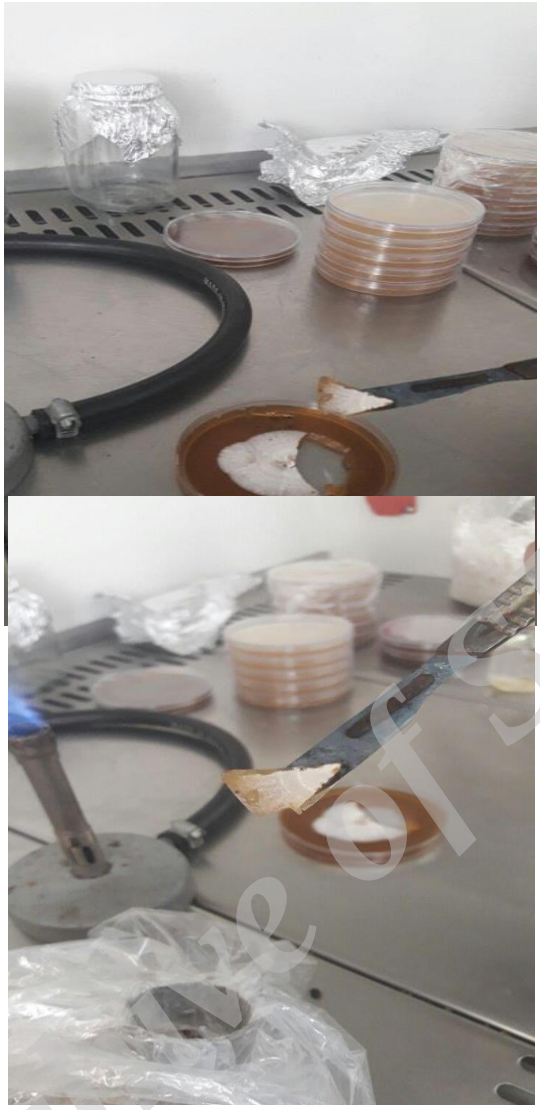
۳-۶- تهیه اسپاون از کشت‌های خالص

۳-۶-۱- تهیه اسپاون بر پایه دانه غلات

مراحل تهیه و نگهداری اسپاون بر پایه غلات در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد بر اساس تغییراتی در روش فارسی و پوریان‌فر (۱۳۹۰) انجام شد. به ازای هر کیلوگرم گندم خام تازه و خشک، یک لیتر آب اضافه شده و در روی شعله به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. پس از صاف کردن، خنک شدن و خشک کردن، مقدار ۶ گرم کربنات کلسیم به‌منظور تنظیم اسیدیته گندم و مقدار ۱۸ گرم سولفات کلسیم به‌منظور کاهش چسبندگی دانه‌های گندم اضافه و مخلوط شد. سپس مخلوط حاضر به درون کیسه‌های پلاستیکی پروپیلن یک لیتری استریل ریخته و در اتوکلاو با فشار ۱/۶ اتمسفر و مدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از سرد شدن، دو تا سه قطعه میسلیومی به قطر تقریبی ۳ سانتی‌متر از کشت‌های خالص میسلیومی برداشته و درون دانه‌های گندم قرار داده شد. کیسه‌ها سپس در دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۳-۷).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳-۷- تهیه اسپاون قارچ‌های بومی بر پایه دانه غلات

تصاویر در تیر-مرداد ۱۳۹۶ در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد ثبت شده‌اند. قطعات حدوداً ۳ سانتی‌متری میسلیومی از یک کشت تازه مستقیماً به درون کیسه حاوی دانه گندم آماده‌شده (اسپاون) قرار داده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۶-۲- تهیه اسپاون بر پایه گندم-خاک اره

تهیه اسپاون برای قارچ‌های کلاهک‌دار دارویی بر پایه خاک اره بر اساس تغییراتی در روش Erkel, (2009) انجام گردید. مراحل تهیه و نگهداری این اسپاون در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد انجام شد. برای تهیه اسپاون بر پایه گندم-خاک اره، ابتدا مراحل آماده سازی دانه‌های گندم مطابق توضیحات قبلی انجام شد. سپس به ازای هر کیلوگرم گندم جوشیده شده صاف‌شده، ۲۵۰ گرم خاک‌اره (از قبل خیس‌خورده) اضافه شد. پس از صاف کردن، خنک شدن و خشک کردن، مقدار ۱۰ گرم کربنات کلسیم به‌منظور تنظیم اسیدیته گندم و مقدار ۵۰ گرم سولفات کلسیم به‌منظور کاهش چسبندگی مخلوط دانه‌های گندم و خاک‌اره اضافه و مخلوط شد. سپس مخلوط حاضر به درون کیسه‌های پلاستیکی پروپیلن یک لیتری استریل ریخته و در اتوکلاو با فشار ۱/۶ اتمسفر و مدت ۲ ساعت قرار داده شد. پس از سرد شدن، دو تا سه قطعه میسلیومی به قطر تقریبی ۳ سانتی‌متر از کشت‌های خالص میسلیومی برداشته و درون دانه‌های گندم قرار داده شد. کیسه‌ها سپس در دمای ۲۵-۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۳-۸).

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۳-۸- تهیه اسپاون قارچ‌های بومی بر پایه مخلوط گندم-خاک اره

تصاویر در تیر-مرداد ۱۳۹۶ در آزمایشگاه اسپاون جهاددانشگاهی مشهد ثبت شده‌اند. مخلوط کردن دانه‌های گندم با خاک‌اره نشان داده شده است. بر اساس روش بهینه‌سازی شده، ظروف شیشه‌ای متناسب با این نوع اسپاون نبودند و لذا در مراحل بعدی آزمایش تمرکز فقط روی ظروف پلاستیکی پروپیلن بود.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۷- زراعی‌سازی قارچ‌های کلاهک‌دار بومی بازیدیومایست

در این طرح، تراشه چوب به عنوان بستر کشت اصلی جهت آزمون میوه دهی جدایه‌های وحشی بازیدیومایست (که بر عکس آسکومایست‌ها امکان بالقوه تولید اندام باردهی بدون نیاز اجباری به میزبان را دارند) به کار گرفته شد، چراکه رویشگاه اصلی جدایه‌ها، چوب‌های جنگل‌های مازندران بود. به طور خلاصه، تراشه چوب با ۱۵ درصد سبوس گندم غنی گردید. تراشه‌های چوب حدود ۱۸ ساعت خیسانده شد. پس از آبکش کردن و گرفتن آب اضافی، سبوس و همچنین ۳ درصد آهک ($CaCO_3$) اضافه و با تراشه‌ها مخلوط شدند. بسترها به وزن حدود ۶۰۰ گرم درون کیسه‌های پلاستیک سلوفان آماده شدند. از لوله پولیکا و درپوش پنبه‌ای نیز برای پوشش سر بسته‌ها و تهویه مناسب بسته‌ها استفاده شد. کیسه‌ها سپس در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۶ اتمسفر و زمان ۱۲۰ دقیقه استریل شدند. برای تولید اسپاون، از بذر غلات خصوصاً گندم برای ماده زمینه‌ای اسپاون قارچ به خاطر سرعت توسعه شبکه میسلیومی که ارتباط مستقیمی با محتوای رطوبت آن دارد استفاده می‌شود که در مورد برخی جدایه‌ها به دلیل عدم رشد در بستر بذر غلات، مستقیم یک یا دو قطعه به قطر ۱ سانتیمتر از کشت خالص تازه جدایه ها بر روی بستر تراشه چوب استفاده گردید. سپس بسترها به انکوباتور در درجه حرارت ۲۴ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. همچنین اسپاون‌زنی به میزان سه درصد وزن‌تر بستر کشت انجام گرفت کیسه‌های بستر کشت تازه اتوکلاو شده پس از خنک شدن، زیر هود استریل مایه‌کوبی گردید و سپس به اتاق رشد تاریک (انکوباتور) دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد تا سفید شدن کامل بستر قرار داده شد که این مرحله رشد فاز رویشی میسلیوم قارچ است. پس از پر شدن کیسه‌ها از شبکه‌ی میسلیومی قارچ، کیسه‌ها به پایلوت میوه دهی (دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد) انتقال داده شدند. با توجه به شرایط سخت میوه دهی جدایه‌های وحشی مورد آزمایش در این طرح، و سهولت تولید اندام باردهی، چند تکرار از بستر هر جدایه در شرایط پیش سرمایشی قرار

Archive of SID

www.SID.ir

داده شد بطوریکه به مدت ۱۰-۸ روز در یخچال ۹-۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. تکرارهای دیگر بدون گذراندن این مرحله مستقیما وارد فاز زایشی شدند. پایلوت میوه دهی در این طرح متشکل از یک سالن در انتهای گلخانه تولید قارچ گروه پژوهشی زیست فناوری قارچ‌های صنعتی به ابعاد ۴ در ۵ متر بود. کیسه‌ها تحت شرایط ۸۵ تا ۹۰ درصد رطوبت و دمای ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد و بر روی تخت‌های فلزی دارای توری‌های مشبک قرار داده شدند. همچنین نرده‌های فلزی بالای تخت‌ها برای آویزان کردن چند نمونه از بسترها به منظور مشاهده اجسام ته سنجاقی (اندام زایشی اولیه) مورد استفاده قرار گرفتند. در صورت موفقیت در تولید اندام باردهی، در شرایط انجماد در خلاء خشک شده و در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده در طرح‌های آتی نگهداری شدند.

۳-۸- کشت تعلیقی میسلیوم

در این طرح با توجه به ماهیت بومی بودن و غیر زراعی بودن بسیاری از گونه‌های جمع آوری شده، و به منظور پایه‌ریزی مطالعات بعدی بر روی اثرات بیولوژیکی متابولیت‌های قارچ‌های وحشی بدست آمده، از کشت تعلیقی نیز استفاده شد و تولید میسلیوم خالص در محیط کشت مایع اندازه‌گیری گردید. به منظور کشت معلق میسلیوم از محیط کشت مایع MGA استفاده گردید (به عنوان بهترین محیط کشت جامد انتخابی که ساخت آن در بند ۳-۵-۱ تشریح شده است). پس از آماده‌سازی محیط کشت، به منظور جلوگیری از آلودگی در شرایط کاملا استریل و در زیر هود مقدار ۴۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع در ویال‌ها ریخته شد. سپس سه قطعه مساوی از میسلیوم (بدون محیط کشت جامد) به قطر ۱ سانتی‌متر در داخل ویال‌ها قرار داده شد. سپس ویال‌ها به دستگاه شیکر در شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

۳-۹- آنالیز آماری و حجم نمونه مورد بررسی

الف) تعداد نمونه مورد بررسی در مراحل مختلف این پژوهش

این پژوهش در هنگام تعریف و تدوین پروپوزال، هدف اصلی پیش بینی شده خود را جمع آوری ۳۰۰ سویه از قارچ های ماکروسکوپی (به ویژه کلاهکدار) و شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی آن‌ها از چهار جنس آگاریکوس، صدفی، شی تاکه و گانودرما در سطح استان مازندران قرار داد. اما در عمل، وابستگی این پژوهش به شرایط آب و هوایی، ابعاد گسترده میدانی آن، ماهیت نمونه‌ها، و تغییرات دیگری در عرصه کلان تحقیقاتی و اجرایی کشور موجب ایجاد تفاوت در تعداد نمونه مورد انتظار با تعداد واقعی نمونه تایید شده گردیدند. برخی از این تحولات و تغییرات عبارت بودند از: شیفت از قارچ‌های خوراکی (نظیر جنس آگاریکوس و صدفی) به قارچ‌های دارویی به ویژه از سال ۱۳۹۵ در طی تدوین برنامه ششم توسعه، مشخص شدن این نکته که قارچ‌های گونه شی‌تاکه (*Lentinula edodes*) در استان مازندارن (و در سایر نقاط ایران) بسیار به ندرت به صورت بومی یافت می‌شوند (و عملا در این طرح یافت نشدند) و مشخص شدن این نکته که قارچ‌های جنس آگاریکوس بومی استان مازندران غالبا از نوع سمی و یا کم ارزش برای تحقیقات هستند. در مقابل، قارچ‌های دارویی مهمی از قبیل دم بوقلمون (*Trametes* sp.) در سطح جهانی و نیز در کشور ما در حال گسترش می‌باشند.

لذا اجرای این طرح تابعی از شرایط و تغییرات فوق الذکر بود تا دستاوردهای آن برای آینده تحقیقات در کشور دارای کاربرد باشد. بنابراین، عملا در بازه زمانی ۱۳۹۶-۱۳۹۴، با توجه به شرایط موجود به هنگام جمع‌آوری نمونه‌ها از مناطق مختلف مازندران (شامل جنگل، کوه و مرتع) در طی ۴ دوره زمانی متفاوت، تعداد ۱۹۸جدایه قارچ کلاهک‌دار (Mushrooms) ترجیحا از جنس‌های قارچ‌های دارویی جمع آوری شد و در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. اما تمامی این ۱۹۸ نمونه به صورت یک حجم نمونه

Archive of SID

www.SID.ir

ثابت و یکسان برای همه مراحل آزمایشی مورد استفاده قرار نگرفت، چراکه این پژوهش ماهیتا از بخش‌های مختلف و متوالی میدانی-عملیاتی، کشت بافت اولیه در محل، کلید مورفولوژیکی، شناسایی مولکولی بر اساس ITS، کشت خالص میسلیومی و زراعی سازی تشکیل شده بود. در نتیجه تعداد نمونه وارده به یک مرحله لزوما با تعداد نمونه تایید شده نهایی در پایان آن مرحله یکسان نبود و در نتیجه تعداد نمونه وارده به هر مرحله با مراحل قبلی متفاوت بود.

علاوه بر ۱۹۸ نمونه فوق الذکر، با توجه به اهداف ذکر شده در پروپوزال، تعداد ۳ جدایه متعلق به ۲ گونه مجزا از جنس آگاریکوس نیز به صورت خشک (به دلیل عدم موفقیت در تولید کشت زنده میسلیومی) تهیه و در مرکز ملی ذخایر ذخیره‌سازی شده است (پیوست ۳). بایستی توجه داشت که در مورد جنس آگاریکوس، شانس موفقیت در کشت جدایه‌های جمع آوری شده حداکثر۵۰ درصد است. برخی گونه‌ها به سختی قابل کشت بوده و برخی به دلیل کهنگی، کند رشد بودن و یا کرم خوردگی قابلیت کشت ندارند. لذا در این طرح، نمونه‌های آگاریکوس به صورت خشک نگهداری شدند. از سویی، نمونه‌های آگاریکوس موجود در جنگل‌های مازندران به دلیل سمی بودن یا فاقد ارزش صنعتی و دارویی بودن ارزش کشت کردن ندارند. گونه‌های بومی آگاریکوس در این طرح عبارت از۳ جدایه است.

ب) آنالیز آماری

آنالیز آماری اصلی در این پژوهش در مرحله آزمایشگاهی کشت خالص میسلیومی در محیط کشت جامد انجام گرفت. تعداد نمونه وارده به این مرحله عبارت بود از ۵۷ جدایه بومی به فرم کشت میسلیوم قارچ کلاهک‌دار. این ۵۷ نمونه بعد از تایید مراحل شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی تهیه شده بودند. اما همه این ۵۷ نمونه به صورت یکجا دریافت نشدند بلکه در طی ۵ سری زمانی با فواصل چندین ماهه (تحت عناوین سری الف، ب، ج، د، ه) به تدریج دریافت شدند. آنالیز آماری در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳

Archive of SID

www.SID.ir

تکرار مستقل به منظور بررسی تاثیر محیط کشت (۴ نوع محیط کشت مختلف) بر روی شاخص‌های رشدی میسلیوم قارچ‌های بومی انجام شد. این شاخص‌ها شامل شاخص‌های کمی از جمله سرعت رشد شعاعی و شاخص‌های کیفی از جمله نوع بافت، تراکم، رنگ و شکل ظاهری رشد بودند. طول دوره مشاهدات ۱۴ روز در نظر گرفته شده و مشاهدات و یادداشت‌برداری‌ها، روزانه انجام شدند. داده‌های سرعت رشد شعاعی میسلیوم توسط نرم افزار JMP نسخه ۸ آنالیز شد. تجزیه واریانس (ANOVA) به صورت یک طرفه توسط نرم افزار مذکور انجام شده و میانگین‌ها از طریق LSD در سطوح معنی‌دار ۰/۰۵ و ۰/۰۱ با یکدیگر مقایسه شدند. توجه به این نکته ضروری است که بیشتر نمونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در حقیقت نژادهای مختلف یا واریته‌های مختلف از گونه‌ها و جنس‌های متفاوت بودند. لذا بررسی اثر متقابل بین نژاد قارچ و محیط کشت در قابل آزمایشات فاکتوریل ضروری است اما به دلیل اینکه این نمونه‌ها به صورت تدریجی و در طی فواصل زمانی چندین ماهه دریافت شدند در عمل امکان انجام همزمان آزمایشات و در نتیجه اطمینان از ثبات شرایط آزمایشگاهی برای همه نمونه‌ها نبود. لذا آزمایشات فاکتوریل برای بررسی اثر متقابل انجام نشد و آنالیزهای آماری در هر سری از دریافت نمونه‌ها به طور مجزا انجام و جداول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ترسیم شد.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل چهارم: یافته‌های تحقیق

۴-۱- مشخصات اولیه قارچ‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف استان مازندران

۴-۱-۱- جنگل‌های نور و رویان

نمونه‌برداری اول از دو منطقه جنگلی رویان و نور در تاریخ ۲۶ تا ۳۱ ام شهریور ۱۳۹۴ انجام گرفت. طی این مرحله از نمونه‌برداری، ۲۴ جدایه جمع آوری شد (جدول ۴-۱). مشخصات این نمونه‌ها اولیه (در بدو جمع آوری) بوده و قبل از کشت بافت و خالص‌سازی می‌باشد. از تعداد ۲۴ جدایه، ۸ جدایه در کشت بافت اولیه قادر به تولید میسلیوم نشده و لذا برای سایر مراحل خالص سازی مورد استفاده قرار نگرفتند. سایر جدایه‌ها کشت خالص تولید کرده و برای سایر مراحل آزمایشی این پژوهش به کار رفتند. ارزیابی اولیه از جنس احتمالی ۲۴ جدایه مذکور، بر اساس شواهد ریخت شناسی نمونه جمع آوری شده در جدول ۴-۱ ارایه شده است. همانگونه که جدول ۴-۱ نشان می‌دهد، در این مرحله از نمونه‌برداری، کشت بافت گونه‌هایی از برخی از جنس‌های مهم قارچ‌های دارویی شناخته شده از جمله *Ganoderma* spp. ، *Pleurotus* spp. و *Volvariella* spp. موفقیت آمیز بود اما برخی دیگر از قارچ‌های دارویی مهم از جمله دم بوقلمون (*Trametes* spp.) قادر به تولید میسلیوم اولیه نشدند. در شکل ۴-۱ (الف تا د)، تصاویر واقعی برخی از این نمونه‌ها هنگام جمع‌آوری به همراه موقعیت جغرافیایی دقیق مکان مربوطه ارایه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۱- مشخصات اولیه ۲۴ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری اول از جنگل‌های نور و رویان

ردیف	کد اولیه[1]	شناسایی اولیه (جنس)	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۱	Royan 1	*Leucoagaricus*	Successful	-
۲	Royan 2	*Omphalotus*	Failed	-
۳	Royan 3	*Pleurotus*	Successful	-
۴	Royan 4	*Lactarius* and *Russula*	Successful	-
۵	Royan 5	*Scleroderma*	Successful	-
۶	Royan 6	*Omphalotus*	Successful	-
۷	Royan 7	*Pleurotus*	Successful	-
۸	Royan 8	*Lenzites*	Successful	-
۹	Nur 1	*Xerula*	Failed	N36 34.336 E51 47.745, 54 m
۱۰	Nur 2	*Pleurotus*	Successful	-
۱۱	Nur 3	*Ganoderma lucidium*	Successful	-
۱۲	Nur 4	*Ganoderma lucidium*	Successful	-
۱۳	Nur 5	*Lactarius*	Failed	-
۱۴	Nur 6	*Ganoderma lucidium*	Failed	-
۱۵	Nur 7	*Pleurotus*	Failed	-
۱۶	Nur 8	*Polypore*	Successful	-
۱۷	Nur 9	*Mycena?*	Successful	-
۱۸	Nur 10	*?*	Successful	-
۱۹	Nur 11	*?*	Failed	-
۲۰	Nur 12	*Polypore*	Successful	-
۲۱	Nur 14	*Trametes*	Failed	N36 32.977 E52 04.802, 24 m
۲۲	Nur 16	*Volvariella*	Successful	N36 34.335 E51 47.770, 55 m
۲۳	Nur 20	*?*	Failed	-
۲۴	Nur 30	*Ganoderma lucidium*	Successful	-

Archive of SID

www.SID.ir

[1] توضیحات در مورد کدها:

کد Nur به معنای جمع‌آوری از جنگل نور و کد Royan به مفهوم جمع‌آوری از جنگل رویان می‌باشد.

الف- قارچ دارویی *Ganoderma lucidium* (داروی جاودانگی)

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

ب- قارچ دارویی *Ganoderma lucidium* (داروی جاودانگی)

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

Archive of SID

www.SID.ir

پ- قارچ توپ پفکی از جنس ***Scleroderma***

موقعیت جغرافیایی: جنگل رویان

ت- قارچ اکتومایکوریز از جنس ***Lactarius***

موقعیت جغرافیایی: جنگل رویان

Archive of SID
www.SID.ir

ث- قارچ از جنس ***Omphalotus***

موقعیت جغرافیایی: جنگل رویان

ج- قارچ‌هایی از جنس ***Lenzites***

موقعیت جغرافیایی: جنگل رویان

Archive of SID

www.SID.ir

چ- قارچی از جنس ***Leucoagaricus***

موقعیت جغرافیایی: جنگل رویان

ح- قارچ از جنس ***Xerula***

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

Archive of SID

www.SID.ir

خ- قارچ از جنس *Mycena*

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

د- قارچ دارویی دم بوقلمون از جنس *Trametes*

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

شکل ۴-۱- تصاویر اصلی برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های نور و رویان (الف تا د)

تصاویر فوق در هنگام جمع‌آوری نمونه قارچ‌های کلاهک‌دار از جنگل‌های نور و رویان به همراه موقعیت دقیق جغرافیایی آنها در شهریور ۱۳۹۴ ثبت شده است. جنس یا گونه ذکر شده برای این نمونه‌ها، تخمینی بوده و قبل از شناسایی دقیق مولکولی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۱-۲- نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا (شرق مازندران)

نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا در تاریخ ۳۰ ام فروردین تا دوم اردیبهشت ۱۳۹۵ انجام گرفت. طی این نمونه‌برداری، ۳۷ جدایه قارچ کلاهک‌دار جمع آوری شد. این تعداد متعلق به ۱۸ تا ۲۲ جنس بودند. از این تعداد ۲۲ نمونه کشت بافت زنده به دست آمد که متعلق به حداقل ۱۴ جنس بودند. جدول ۴-۲ مشخصات اولیه این نمونه‌ها (در بدو جمع آوری) و قبل از کشت بافت و خالص‌سازی را نشان می‌دهد. همانگونه که جدول ۴-۲ نشان می‌دهد، در این مرحله از نمونه‌برداری، کشت بافت زنده از برخی از جنس‌های مهم قارچ‌های دارویی به‌ویژه تعداد نمونه زیادی از قارچ دارویی *Ganoderma* spp. و دم بوقلمون (*Trametes* spp.) موفقیت آمیز بود. اما برخی دیگر از قارچ‌های دارویی مهم از جمله *Schizophyllum commune* قادر به تولید میسلیوم اولیه نشدند. در شکل ۴-۲ (الف تا ض) تصاویر واقعی برخی از این نمونه‌ها هنگام جمع‌آوری به همراه موقعیت جغرافیایی دقیق مکان مربوطه ارایه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۲- مشخصات اولیه ۳۷ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا

ردیف	کد اولیه[1]	شناسایی اولیه (جنس)	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۱	Bozchaft1	*Trametes*	-	-
۲	Bozchaft2	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 22.581 E52 46.596, 287m
۳	Bozchaft3	*Schizophyllum commune*	Failed	-
۴	Darabkola1	*Pluorotus?*	Successful	N36 30.351 E53 18.597, 661m
۵	Darabkola2	*Hypholoma*	Failed	N36 30.338 E53 18.605, 659m
۶	Darabkola3	*Crepidotus*	-	N36 30.321 E53 18.567, 659m
۷	Darabkola4	*Trametes*	Successful	N36 30.283 E53 18.589, 661m
۸	Darabkola5	*Lenzites*	-	-
۹	Darabkola6	*Stereum*	-	N36 30.297 E53 18.61, 660m
۱۰	Darabkola7	*Pluorotus?*	Failed	-
۱۱	Darabkola8	*Coral*	Successful	N36 30.094 E53 18.015, 671m
۱۲	Darabkola9	*Trametes*	Successful	-
۱۳	Darabkola11	*?*		N36 29.574 E53 18.787, 679m
۱۴	Darabkola12	*Stereum*	-	-
۱۵	Darabkola13	*Trametes*	Successful	N36 29.428 E53 17.520, 662m
۱۶	Darabkola15	*Trametes*	Successful	N36 28.269 E53 20.272, 860m
۱۷	Darabkola16	*collybia?*	Successful	-
۱۸	Darabkola17	*?*	Successful	N36 28.288 E53 20.248, 861m
۱۹	Darabkola18	*Exidia*	Successful	N36 28.291 E53 20.257, 860m

Archive of SID
www.SID.ir

ردیف	کد اولیه[1]	شناسایی اولیه (جنس)	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۲۰	Darabkola19	*collybia?*	Failed	N36 28.297 E53 20.239, 852m
۲۱	Darabkola20	*Agrocybe*	Successful	N36 28.3 E53 20.224, 852m
۲۲	Darabkola 21	*Fomes*	Successful	-
۲۳	Darabkola22	*Stereum*	-	-
۲۴	Darabkola23	*Daldinia*	-	N36 30.342 E53 18.547, 660m
۲۵	Neka20	*Helvella*	-	-
۲۶	Neka22	*Cup fungi*	Successful	-
۲۷	Neka23	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 33.392 E53 22.512, 219m
۲۸	Neka24	*Hydnellum*	Successful	-
۲۹	Neka25-1	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 33.476 E53 22.681, 190m
۳۰	Neka25-2	*Trametes*	Successful	-
۳۱	Neka26-1	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 26.578 E53 27.421, 941m
۳۲	Neka26-2	*Pluorotus?*	Failed	N36 23.232 E53 23.155, 877m
۳۳	Neka27-1	*?*	Failed	-
۳۴	Neka27-2	*?*	Successful	-
۳۵	Neka28	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 23.229 E53 23.162, 879m
۳۶	Neka29-1	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 23.249 E53 23.191, 874m
۳۷	Neka29-2	*Xylaria*	Successful	N36 23.231 E53 23.162, 878m

[1] توضیحات در مورد کدها:

کدهای Bozchaft، Darabkola، و Neka به ترتیب به معنای جمع‌آوری نمونه‌های قارچ از جنگل‌های بزچافت، داراب‌کلا و نکا می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

الف- قارچ احتمالا *Schizophyllum commune*

موقعیت جغرافیایی: جنگل بزچافت

ب- قارچ متعلق به جنس *Hypholoma*

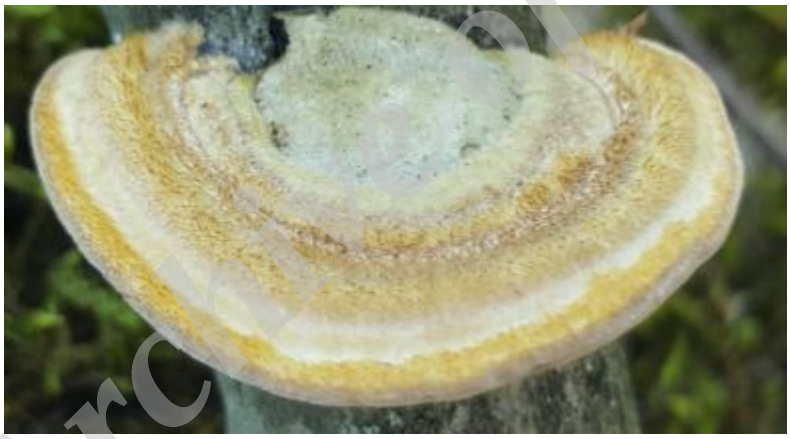
موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

Archive of SID

www.SID.ir

پ- قارچ متعلق به جنس ***Crepidotus***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا،



ت- قارچ متعلق به جنس ***Trametes***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

Archive of SID

www.SID.ir

ث- قارچ متعلق به جنس ***Pleurotus***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

ج- قارچ متعلق به جنس ***Coral***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

Archive of SID

www.SID.ir

چ- قارچ متعلق به جنس ***Trametes***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

ح- قارچ متعلق به جنس ***Collybia***

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

Archive of SID

www.SID.ir

خ- قارچ متعلق به جنس *Agrocyb*

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

د- قارچ متعلق به جنس *Fomes*

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

Archive of SID

www.SID.ir

ذ- قارچ متعلق به جنس *Daldinia*

موقعیت جغرافیایی: جنگل داراب‌کلا

ر- قارچ متعلق به جنس **Cup fungi**

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا

Archive of SID

www.SID.ir

ز- قارچ متعلق به جنس *Ganoderma applanatum*

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا

ژ- قارچ متعلق به جنس ***Ganoderma applanatum***

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا

Archive of SID

www.SID.ir

س- قارچ متعلق به جنس *Ganoderma applanatum*

موقعیت جغرافیایی: نکا،

ش- قارچ متعلق به جنس *Pleurotus*

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا

Archive of SID

www.SID.ir

ص- **قارچ متعلق به جنس *Ganoderma applanatum***

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا

ض- قارچ متعلق به جنس ***Xylaria***

موقعیت جغرافیایی: جنگل نکا،

شکل ۴-۲- تصاویر اصلی برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های بابل، ساری و نکا (الف تا ض)

تصاویر فوق در هنگام جمع‌آوری نمونه قارچ‌های کلاهک‌دار از جنگل‌های بابل، ساری و نکا به همراه موقعیت دقیق جغرافیایی آنها در فروردین- اردیبهشت ۱۳۹۵ ثبت شده است. جنس یا گونه ذکر شده برای این نمونه‌ها، تخمینی بوده و قبل از شناسایی دقیق مولکولی می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

۴-۱-۳- نمونه‌برداری از جنگل‌های نور، چالوس و رامسر

نمونه‌برداری از جنگل‌های نور، کشپل به سمت لاویج و سیسنگان در تاریخ چهارم تا هفتم خرداد ۱۳۹۵ انجام گرفت. طی این نمونه‌برداری ۲۷ جدایه جمع آوری شد. از این تعداد ۱۱ نمونه کشت بافت زنده به دست آمد. جدول ۴-۳ مشخصات اولیه این نمونه‌ها (در بدو جمع آوری) و قبل از کشت بافت و خالص‌سازی را نشان می‌دهد. همانگونه که جدول ۴-۳ نشان می‌دهد، در این مرحله از نمونه‌برداری، کشت بافت زنده از برخی از جنس‌های مهم قارچ‌های دارویی به‌ویژه تعداد نمونه زیادی از قارچ دارویی *Ganoderma* spp. و دم بوقلمون (*Trametes* spp.) موفقیت آمیز بود، اما قارچ‌های دارویی همچون *Coprinus* قادر به تولید میسلیوم در کشت بافت اولیه نبودند. در شکل ۴-۳ (الف تا ث)، تصاویر اصلی برخی از این نمونه‌ها هنگام جمع‌آوری به همراه موقعیت جغرافیایی دقیق مکان مربوطه ارایه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۳- مشخصات اولیه ۲۷ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری از نور، چالوس و رامسر

ردیف	کد اولیه[1]	مکان	شناسایی اولیه	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۱	GPS004	جنگل نور	شناسایی نشده	Failed	N36 32.990 E52 04.781, 19 m
۲	GPS005	جنگل نور	شناسایی نشده	Successful	N36 32.991 E52 04.780, 18 m
۳	GPS006	جنگل نور	*Ganoderma lucidium*	Failed	N36 32.999 E52 04.776, 19 m
۴	GPS007	جنگل نور	*Trametes*	Successful	N36 32.994 E52 04.776, 19 m
۵	GPS008	جنگل نور	*Coprinus*	Failed	N36 32.999 E52 04.782, 19 m
۶	GPS009	جنگل نور	شناسایی نشده	Successful	N36 32.994 E52 04.792, 19 m
۷	GPS010	جنگل نور	*Mycena*	Failed	N36 32.990 E52 04.791, 20 m
۸	GPS011	جنگل نور	شناسایی نشده	Failed	N36 32.987 E52 04.772, 22 m
۹	GPS012	جنگل نور	شناسایی نشده	Successful	N36 32.977 E52 04.802, 24 m
۱۰	GPS013	جنگل نور	*Mycena*	Failed	N36 32.979 E52 04.778, 23 m
۱۱	GPS014	جنگل نور	*Crepidotus*	Failed	N36 32.981 E52 04.785, 20 m
۱۲	GPS015	جنگل نور	*Trametes*	Failed	N36 32.964 E52 04.770, 19 m
۱۳	GPS016	جنگل نور	*Trametes*	Failed	N36 32.981 E52 04.727, 18 m
۱۴	GPS017	جنگل نور	*Ganoderma applanatum*	Successful	N36 32.991 E52 04.727, 17 m
۱۵	GPS018	جنگل کشپل	*Trametes*	Successful	N36 26.020 E52 04.026, 289 m
۱۶	GPS019	جنگل کشپل	شناسایی نشده	Successful	N36 26.152 E52 04.036, 282 m
۱۷	GPS020	جنگل کشپل	شناسایی نشده	Failed	N36 26.007 E52 03.988, 340 m
۱۸	GPS021	کشپل به سمت لاویج	شناسایی نشده	Failed	N36 23.737 E52 01.908, 692 m

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۳- مشخصات اولیه ۲۷ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری از نور، چالوس و رامسر

ردیف	کد اولیه[1]	مکان	شناسایی اولیه	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۱۹	GPS022	کشپل به سمت لاویج	*Trametes*	Successful	N36 23.738 E52 01.905, 331 m
۲۰	GPS023	جنگل سی‌سنگان	*Trametes*	Failed	N36 23.738 E52 01.905, 234 m
۲۱	GPS024	جنگل سی‌سنگان	شناسایی نشده	Failed	N36 27.778 E52 04.562, 168 m
۲۲	GPS025	جنگل سی‌سنگان	*Trametes*	Failed	N36 34.343 E51 47.873, 57 m
۲۳	GPS026	جنگل سی‌سنگان	*Trametes*	Successful	N36 34.353 E51 47.872, 58 m
۲۴	GPS027	جنگل سی‌سنگان	*Crepidotus*	Failed	N36 34.352 E51 47.868, 58 m
۲۵	GPS028	جنگل سی‌سنگان	*Pleurotus*	Failed	N36 34.352 E51 47.872, 58 m
۲۶	GPS029	جنگل سی‌سنگان	شناسایی نشده	Successful	N36 34.335 E51 47.770, 55 m
۲۷	GPS030	جنگل سی‌سنگان	شناسایی نشده	Successful	N36 34.338 E51 47.767, 56 m

[1] توضیحات در مورد کدها:

کدهای GPS معرف شماره‌های مختلف نمونه‌برداری در مناطق مختلف است و در ستون بعدی نام جنگل مورد نظر ارائه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

الف- قارچ متعلق به جنس *Coprinus*

موقعیت جغرافیایی: جنگل نور

ب- قارچ از جنس *Crepidotus*

موقعیت جغرافیایی: جنگل سی‌سنگان

Archive of SID

www.SID.ir

پ- قارچ از جنس *Trametes*

موقعیت جغرافیایی: جنگل سی‌سنگان

ت- قارچ از جنس *Pleurotus*

موقعیت جغرافیایی: جنگل سی‌سنگان

Archive of SID

www.SID.ir

ث- قارچ‌هایی از جنس Trametes

موقعیت جغرافیایی: جنگل سی‌سنگان،

شکل ۴-۳- تصاویر برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از جنگل‌های نور، چالوس و رامسر (الف تـا ث)

تصاویر فوق در هنگام جمع‌آوری نمونه قارچ‌های کلاهک‌دار از جنگل‌های نور، چالوس و رامسر به همراه موقعیت دقیق جغرافیایی آنها در خرداد ۱۳۹۵ ثبت شده است. جنس یا گونه ذکر شده برای این نمونه‌ها، تخمینی بوده و قبل از شناسایی دقیق مولکولی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۱-۴- نمونه‌برداری از جنگل‌های رامسر، بهشهر، ساری، کلاردشت

نمونه‌برداری از جنگل‌های صفارود رامسر، زیرآب به لاجیم ساری، عباس آباد بهشهر و کلاردشت به عباس آباد، در تاریخ‌های پنجم، ششم، بیستم و بیست و یکم آبان ۱۳۹۵ انجام گرفت. طی این نمونه‌برداری ۱۱۰ جدایه جمع‌آوری شد که ۴۲ جدایه به طور موفقیت آمیزی مورد کشت بافت قرار گرفتند. به دلیل حجم بالای نمونه‌برداری در این مرحله، جدول ۴-۴ تنها مشخصات اولیه نمونه‌های موفق در کشت بافت را نشان می‌دهد. همانگونه که جدول ۴-۴ نشان می‌دهد، در این مرحله از نمونه‌برداری، کشت بافت زنده از تعداد زیادی جنس‌های مهم قارچ‌های دارویی به‌ویژه *Ganoderma* spp.، *Armillaria* spp.، *Pleurotus* spp. ، دم بوقلمون (*Trametes* spp.)، *Schizophyllum commune* و *Fomes* spp. بدست آمد. در شکل ۴-۴ تصاویر اصلی برخی از این نمونه‌ها هنگام جمع‌آوری به همراه موقعیت جغرافیایی دقیق مکان مربوطه ارایه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۴- مشخصات اولیه ۴۲ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری اول از رامسر، بهشهر، ساری، کلاردشت (آبان ۹۵)

ردیف	کد اولیه[1]	شناسایی اولیه (جنس)	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۱	173	*Armillaria mellea*	Success	N36 14 17.5 E53 03 19.3, 860 m
۲	175	*Armillaria mellea*	Success	N36 14 15.9 E53 03 19.4, 864 m
۳	189	*Armillaria mellea*	Success	N36 39 17.0 E53 35 57.0, 526 m
۴	188	*coral*	Success	N36 39 14.5 E53 35 52.3, 527 m
۵	132	*Crepidotus*	Success	N36 50 41.9 E50 33 42.0, 1279 m
۶	131	*Fomes*	Success	N36 50 42.1 E50 33 41.6, 1280 m
۷	111	*Ganoderma applanatum*	Success	N36 38 24.2 E51 06 45.6, 415 m
۸	148	*Ganoderma applanatum*	Success	N36 52 34.4 E50 33 31.6, 656 m
۹	150	*Ganoderma applanatum*	Success	N36 52 34.1 E50 33 33.9, 658 m
۱۰	193	*Ganoderma applanatum*	Success	N36 39 19.5 E53 35 59.5, 500 m
۱۱	209	*Ganoderma applanatum*	Success	N36 39 20.5 E53 35 15.3, 387 m
۱۲	172	*Ganoderma lucidium*	Success	N36 14 18.8 E53 03 20.1, 862 m
۱۳	186	*Ganoderma lucidium*	Success	N36 39 14.4 E53 35 52.0, 519 m
۱۴	194	*hericium*	Success	N36 39 15.8 E53 36 01.6, 515 m
۱۵	106	*Hypholoma*	Success	N36 38 21.4 E51 06 44.3, 406 m
۱۶	177	*hypholoma*	Success	N36 14 15.4 E53 03 19.1, 853 m
۱۷	168	*hypholoma shebhe*	Success	N36 14 19.4 E53 03 20.7, 882 m
۱۸	101	*Macrolepiota*	Success	N36 38 19.7 E51 06 35.7, 375 m
۱۹	163	شناسایی نشده	Success	N36 12 32.9 E53 01 01.6, 435 m
۲۰	208	شناسایی نشده	Success	N36 39 25.9 E53 35 27.8, 395 m

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۴- مشخصات اولیه ۴۲ نمونه جمع آوری شده در نمونه‌برداری اول از رامسر، بهشهر، ساری، کلاردشت (آبان ۹۵)

ردیف	کد اولیه[1]	شناسایی اولیه (جنس)	کشت بافت	موقعیت جغرافیایی (طول و عرض، ارتفاع از سطح دریا بر حسب متر)
۲۱	142	*Pholiota*	Success	N36 52 32.6 E50 33 30.7, 669 m
۲۲	196	*pleurotus*	Success	N36 39 15.7 E53 36 01.8, 513 m
۲۳	157	*pleurotus*	Success	N36 52 34.5 E50 33 34.6, 692 m
۲۴	184	*pleurotus*	Success	N36 39 12.2 E53 35 53.3, 525 m
۲۵	180	*Polyporus sp.*	Success	N36 14 17.2 E53 03 16.5, 836 m
۲۶	158	*puffbal*	Success	N36 52 34.6 E50 33 34.3, 703 m
۲۷	145	*schizophyllum commune*	Success	N36 52 32.8 E50 33 30.3, 666 m
۲۸	176	*Stropharia aeruginosa*	Success	N36 14 15.5 E53 03 18.8, 860 m
۲۹	107	*Trametes*	Success	N36 38 21.2 E51 06 44.6, 407 m
۳۰	119	*Trametes*	Success	N36 50 49.3 E50 33 44.9, 1265 m
۳۱	122	*Trametes*	Success	N36 50 49.7 E50 33 45.1 , 1271 m
۳۲	128	*Trametes*	Success	N36 50 47.6 E50 33 47.6, 1271 m
۳۳	130	*Trametes*	Success	N36 50 45.7 E50 33 48.0, 1273 m
۳۴	146	*Trametes*	Success	N36 52 32.9 E50 33 29.8, 661 m
۳۵	147	*Trametes*	Success	N36 52 34.3 E50 33 31.4, 667 m
۳۶	174	*Trametes ver.*	Success	N36 14 17.4 E53 03 19.9, 861 m
۳۷	179	*Trametes giboza*	Success	N36 14 16.9 E53 03 16.6, 837 m
۳۸	167	*Trametes zir siah*	Success	N36 14 21.3 E53 03 19.6, 480 m
۳۹	197	*Xerula*	Success	N36 39 15.8 E53 36 02.0, 512 m
۴۰	140	*xylaria*	Success	N36 52 32.5 E50 33 28.5, 676 m
۴۱	153	*xylaria*	Success	N36 52 34.2 E50 33 33.3, 685 m
۴۲	182	*xylaria sefid*	Success	N36 39 12.1 E53 35 53.3, 567 m

[1] توضیحات در مورد کدها:

کدها معرف جدایه‌ها هستند و موقعیت دقیق جغرافیایی هر جدایه ارائه شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

الف- قارچ متعلق به جنس *Ganoderma applanatum*

موقعیت جغرافیایی: عباس آباد بهشهر

ب- قارچ متعلق به جنس *Xerula*

موقعیت جغرافیایی: عباس آباد بهشهر

Archive of SID

www.SID.ir

پ- قارچ متعلق به جنس *Hericium*

موقعیت جغرافیایی: عباس آباد بهشهر

شکل ۴-۴- تصاویر برخی از نمونه‌های قارچ‌های بومی جمع‌آوری شده از بهشهر (الف تا پ)

تصاویر فوق در هنگام جمع‌آوری نمونه قارچ‌های کلاهک‌دار از جنگل‌های **رامسر، بهشهر، ساری و کلاردشت** به همراه موقعیت دقیق جغرافیایی آنها در ۲۱ آبان ۱۳۹۵ ثبت شده است. جنس یا گونه ذکر شده برای این نمونه‌ها، تخمینی بوده و قبل از شناسایی دقیق مولکولی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۲- کلید مورفولوژیکی جدایه‌های قارچ

پس از جمع‌آوری قارچ‌های بومی و ثبت تصاویر و موقعیت جغرافیایی آنها، شاخصه‌های ریخت‌شناسانه آنها بررسی و ثبت شد. این شاخصه‌ها در مراحل مختلف هم بر روی نمونه اولیه زنده در محل جمع‌آوری انجام شد (ثبت مشخصات اولیه‌ی ماکروسکوپی نمونه‌ها در نقطه نمونه‌برداری، آزمون‌های شیمیایی و برش طولی) و هم بر روی نمونه خشک در آزمایشگاه بعد از جمع آوری (شناسایی مبتنی بر مشاهدات میکروسکوپی اسپورها و هیف‌ها و بررسی مشخصات مورفولوژیکی و مقایسه آن با رفرنس‌های معتبر مرتبط). مجموع این بررسی‌ها منجر به شناسایی تقریبا با اطمینان بالای جنس قارچ مورد نظر شده و سپس در صورت موفقیت در تولید کشت بافت زنده، این نمونه‌ها برای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به آنکه برخی از نمونه‌های جمع‌آوری شده قادر به تولید میسلیوم نبودند و برای سایر مراحل تعیین گونه مولکولی و کشت و خالص سازی استفاده نشدند، لذا در پیوست ۳ نتایج کلید مورفولوژیکی تنها برای جدایه‌هایی ارایه می‌شود که کشت بافت موفقی داشته و بعدا در آزمایشات مولکولی و کشت و خالص‌سازی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

Archive of SID

www.SID.ir

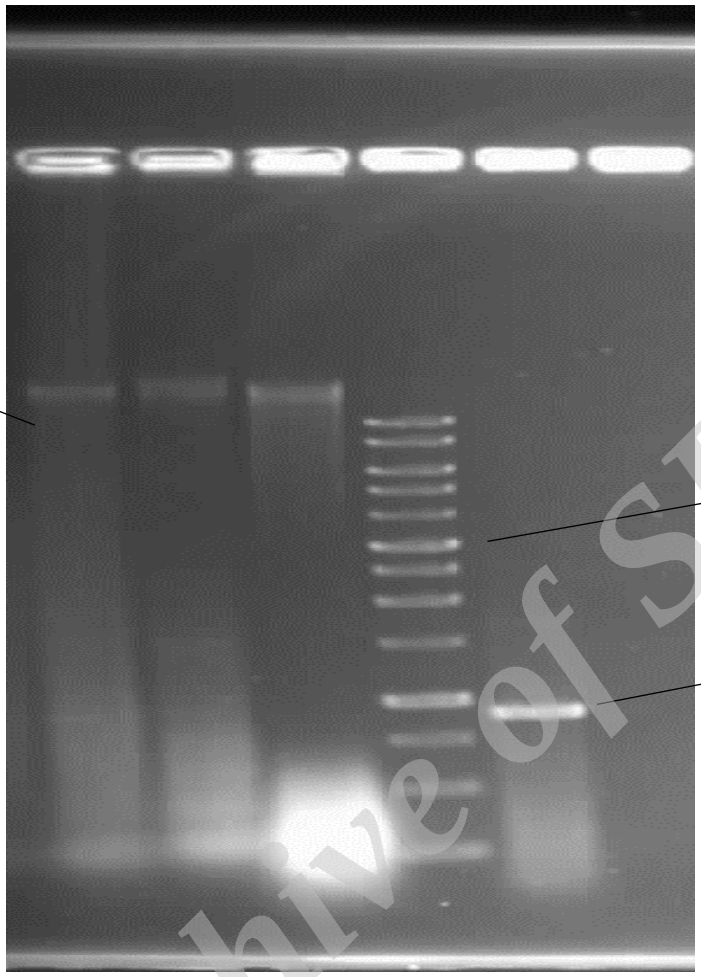
۴-۳- آنالیز توالی ITS

۴-۳-۱- استخراج DNA

مولکول DNAی هریک از جدایه‌های قارچ بومی طبق پروتوکول بیان شده در مواد و روش‌ها استخراج گردید. همانطور که در تصویر ۴-۵ دیده می‌شود، کیفیت مولکول DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ مورد بررسی قرار گرفت. ظهور یک باند ضخیم با طول بیش از ۳ Kb بر روی ژل بدون شکستگی و اسمیر حاکی از مطلوب بودن شرایط استخراج DNA جدایه‌های قارچی بود.

Archive of SID

www.SID.ir



تصویر ۴-۵- نمونه‌ای از DNA استخراج شده از یکی از ایزوله های قارچ کلاهک‌دار بر روی ژل آگارز

Archive of SID

www.SID.ir

همانطور که تصویر ۴-۵ نشان می‌دهد با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 نواحی ITS1، ناحیه 5.8S و ناحیه ITS2 به طور کامل تکثیر می شوند. توالی ناحیه ITS در ژنوم یوکاریوت ها تنوع قابل توجهی به لحاظ اندازه و توالی است. ناحیه ITS در قارچها طولی حدود bp ۶۰۰-۵۰۰ دارد.

۴-۳-۲- تایید مولکولی گونه‌ها

تعیین توالی برای سویه‌های قارچ‌های بومی مطابق جدول ۴-۵ انجام شد و بررسی شباهت توالی‌های مربوطه در پایگاه های اطلاعات نوکلئوتید در GenBank از NCBI و با استفاده از برنامه BLASTn بررسی گردید. نتایج بررسی شباهت توالی سویه‌های قارچ‌های کلاهک‌دار بومی بر اساس آنالیز شباهت در دیتابیس نوکلئوتید در GenBank از NCBI در زیر آمده است. همچنین آنالیز مشابهی نیز در دیتابیس CBS انجام شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۵- نتایج آنالیز شباهت توالی جدایه‌های بومی در برنامه **BLASTn**

ردیف	کد اولیه سویه‌ها[1]	اولین رکورد گزارش شده بر اساس شباهت	شباهت (%)	شماره دسترسی نزدیکترین جدایه
۱	Neka-24D	*Donkia pulcherrima* voucher Hausknecht & Kovac 6.VII.1998	99%	KX752591.1
۲	101	*Macrolepiota konradii* isolate HAI-989	99%	JQ683125.1
۳	131	*Fomes fomentarius*	99%	KP641149.1
۴	142	*Pholiota aurivella* strain LE-BIN 1831	98%	KT355030.1
۵	158	*Lycoperdon pyriforme* voucher UBC F28394	100%	KP454030.1
۶	176	*Hypholoma fasciculare*	100%	FR686560.1
۷	180	*Lenzites tricolor*	99%	EU661877.1
۸	186	*Ganoderma tsugae* voucher ZJ1025LZ05	99%	KU863094.1
۹	188	Fungal sp. isolate C-GP-L-008_CP-43	99%	KX247439.1
۱۰	196	*Hohenbuehelia auriscalpium*	99%	LN714552.1
۱۱	Darabkola-20	*Cyclocybe sp.*	98%	KM260150.1
۱۲	Darabkola-13	*Trametes sp.*	99%	KC589168.1
۱۳	neka 25-1	*Ganoderma sp.*	99%	KU220014.1
۱۴	neka 25-2	*Trametes sp.*	98%	MF115828.1
۱۵	Royan 1	*Leucoagaricus sp.*	99%	JN940292.1

Archive of SID

www.SID.ir

AF287856.1	99%	*Daedaleopsis sp.*	Royan 8	۱۶
HQ604791.1	99%	*Marasmiellus sp.*	GPS 30	۱۷
KX449504.1	99%	*Trametes sp.*	GPS 130	۱۸
AF163583.1	99%	*Armillaria sp.*	GPS 173	۱۹
KY706169.1	99%	*Trametes sp.*	GPS 179	۲۰
MF375900.1	100%	*Pestalotiopsis versicolor*	Nur 2	۲۱
KR909140.1	99%	*Paraconiothyrium brasiliense*	Royan 6	۲۲
LC014895.1	100%	*Xylariaceae sp.*	D 8	۲۳
MF375900.1	100%	*Pestalotiopsis versicolor*	G 16	۲۴
KU252219.1	100%	*Neopestalotiopsis sp.*	Neka 29-1	۲۵
KX880639.1	99%	*Trametes gibbosa*	G 22	۲۶
DQ093648.1	98%	*Coprinellus disseminatus*	Nur 9	۲۷
KX022942.1	99%	*candolleana Psathyrella*	Nur 10	۲۸
KX664355.1	100%	*Hydnopolyporus fimbriatus*	G 29	۲۹
MF755281.1	100%	*Trametes gibbosa*	Nur 8	۳۰
KX578081.1	99%	*Stereum hirsutum*	Darabkola 1	۳۱
KX880640.1	100%	*Trametes hirsuta*	GPS042	۳۲
JX523620.1	99%	*Xylariaceae sp.*	GPS002	۳۳
MF375901.1	99%	*Pestalotiopsis microspora*	Darabkola 4	۳۴
MG554226.1	100%	*Trametes versicolor*	107	۳۵

Archive of SID

www.SID.ir

MF098691.1	96% (low quality)	*Trametes gibbosa*	GPS063	۳۶
KY824778.1	98%	*Irpex lacteus*	GPS005	۳۷
MG520179.1	95% (low quality)	*Trametes versicolor*	GPS007	۳۸
MG551577.1	100%	*Pochonia chlamydosporia*	197	۳۹
KY977553.1	99%	*Ganoderma sp.*	Bozchaft 2	۴۰
JN588579.1	99%	*Ganoderma sp.*	37	۴۱
JN588579.1	99%	*Ganoderma sp.*	52	۴۲
KX218391.2	99% (low quality)	*Trametes sp.*	122	۴۳
KT343305.1	96% (low quality)	*Ganoderma sp.*	17	۴۴
KU836538.1	100%	*Hypholoma*	106	۴۵
JN588579.1	99%	*Ganoderma sp.*	38	۴۶
LC317626.1	99%	*Irpex sp.*	146	۴۷
KC589148.1	100%	*Trametes sp.*	119	۴۸
		Hypholoma sp.	177	۴۹
		Irpex lacteus	Royan 4	۵۰
		Leucoagaricus sp.	Royan 3	۵۱
		Exidia sp.	D18	۵۲
		در دست شناسایی	GPS057	۵۳
		در دست شناسایی	GPS 12	۵۴

Archive of SID

www.SID.ir

۵۵	GPS 047	در دست شناسایی		
۵۶	GPS 184	بر اساس شناسایی مورفولوژیکی *pleurotus*		
۵۷	GPS 208	در دست شناسایی		
۵۸	GPS 172	بر اساس شناسایی مورفولوژیکی *Ganoderma lucidium*		
۵۹	Darabkola 11	در دست شناسایی		
۶۰	GPS 128	بر اساس شناسایی مورفولوژیکی *Trametes*		
۶۱	GPS 167	بر اساس شناسایی مورفولوژیکی *Trametes zir siah*		
۶۲	Darabkola 21	بر اساس شناسایی مورفولوژیکی *fomes*		

[۱]- این کدها مطابق با کدهای اصلی و اولیه‌ی ارائه شده در جداول بند ۴-۱ است. کدهای رسمی هر نمونه (IBRC) صادر شده توسط مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران پس از تکمیل مراحل نگهداری و کنترل کیفی به نمونه مورد نظر اختصاص داده خواهد شد.

پس از اتمام مراحل مختلف جمع‌آوری و تایید گونه، جمع‌بندی انجام شد تا تعیین گردد چه تعداد نمونه جمع‌آوری و چه تعداد از آنها تایید شدند (جدول ۴-۶).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۶- جمع‌بندی نمونه برداری قارچ‌های کلاهک‌دار از استان مازندران

بازه زمانی نمونه برداری	تعداد دوره‌های نمونه‌برداری	تعداد کل جدایه (سویه) جمع‌آوری شده	تعداد کل جدایه (سویه) موفق زنده در کشت بافت اولیه	تعداد کل جدایه (سویه) موفق در شناسایی مورفولوژیکی که برای شناسایی مولکولی ارسال شده است	تعداد کل جدایه (سویه) شناسایی شده از نظر مولکولی	تعداد کل جنس متفاوت شناسایی شده از نظر مولکولی	تعداد کل گونه متفاوت شناسایی شده از نظر مولکولی
۱۳۹۴-۱۳۹۶	۴	۱۹۸	۹۱	۶۲	۵۲	۲۹	۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۳- زراعی‌سازی جدایه‌های تایید گونه شده

در این بخش از طرح، زراعی‌سازی جدایه‌های قارچ‌های کلاهک‌دار بومی انجام شد. هدف از این مرحله، بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم در محیط کشت جامد، رشد رویشی میسلیوم در اسپاون، امکان باردهی برخی از گونه‌های مهم قارچ‌های بومی و همچنین کشت تعلیقی میلسیوم آنها بود. به منظور صرفه‌جویی در زمان، هر سری از جدایه‌هایی که در طی مراحل کلید مرفولوژیکی تایید شده بودند حتی قبل از اینکه آنالیز ITS آنها به اتمام برسد، برای زراعی‌سازی به آزمایشگاه مربوطه ارسال شدند. پس از اتمام آنالیزهای ITS، نام گونه مورد نظر به جای شماره جدایه قرار گرفت. در مجموع، در طی ۵ سری (سری الف تا ه)، ۵۷ جدایه بومی برای زراعی سازی ارسال شدند و مطالعات مختلف زراعی‌سازی روی آنها صورت گرفت. با توجه به اینکه نمونه‌ها به تدریج (در طی ۵ سری) ارسال شده‌اند، آزمایشات زراعی‌سازی الزاما برای هر سری از نمونه‌های تایید شده به طور مجزا انجام و گزارش شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

۴- ۴-۱- زراعی‌سازی سری الف (۹ نمونه)

۴-۴-۱-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری الف)

الف- سرعت رشد شعاعی میسلیوم

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴-۷) نشان داد که تفاوت‌های معنی‌داری بین محیط کشت‌ها از نظر تاثیر بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم در گونه‌های *Donika Pucherima*، *Lenzites tricolor*، *Hohenbuehelia auriscapium*، *Hypholma fasciculare* در سطوح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۱ وجود داشت. لذا نمودارهای تغییرات سرعت رشد شعاعی در اثر انواع محیط کشت برای این قارچ‌ها ترسیم شد (شکل ۴-۶ مکرر). همچنین جدول مقایسه میانگین برای این نمونه‌ها ترسیم شد (جدول ۴-۱۷). در گونه *Donika Pucherima*، دو محیط کشت PDA و MGA بهترین محیط کشت بودند و موجب رشد خیلی سریع (بیش از ۴ میلی‌متر در روز) میسلیوم شدند. اما محیط کشت عصاره کمپوست (CEA) موجب رشد بسیار کند (کمتر از ۱ میلی‌متر در روز) میسلیوم این قارچ شد. نتایج مشابهی با گونه *Lenzites tricolor* بدست آمد اما در مقایسه با گونه *Donika Pucherima* رشد میسلیوم در اثر PDA و MGA سریع (۴-۳ میلی‌متر در روز) و در اثر عصاره کمپوست متوسط (۳-۲ میلی‌متر در روز) بود. اگرچه بهترین محیط کشت برای گونه *Hohenbuehelia auriscapium*، عصاره کمپوست بود اما هیچ کدام از محیط‌های کشت مورد تست نتواستند موجب رشد بیشتر از یک میلی‌متر در روز میسلیوم شوند و لذا در کلاس رشدی بسیار کند قرار گرفتند. *Hypholma fasciculare* تنها در محیط کشت عصاره کمپوست رشد محسوسی داشت (۲-۱ میلی‌متر در روز) و در سایر محیط‌های کشت بسیار کندرشد بود.

Archive of SID

www.SID.ir

از سوی دیگر، نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴-۷) حاکی از عدم تفاوت معنی‌دار بین محیط کشت‌ها از نظر تاثیر بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم در گونه‌های *Ganoderma tsugae*، *Fomes fomentarius*، *Lycopedron pyriforme*، *Macrolepoita konradii* و *Pholiota aurivella* بود.

در حالیکه محیط‌های کشت مورد آزمایش موجب ایجاد رشد متوسط (۳-۲ میلی‌متر در روز) در میسلیوم قارچ‌های *Ganoderma tsugae*، *Pholiota aurivella* و *Fomes fomentarius* شد، رشد میسلیوم قارچ‌های *Lycopedron pyriforme* و *Macrolepoita konradii* بسیار کند (کمتر از یک میلی‌متر در روز) بود.

ب- شاخص‌های رشدی کیفی میسلیوم

مجموع شاخص‌های رشدی میسلیوم گونه‌های قارچ‌های بومی از جمله نوع بافت، تراکم، رنگ و شکل ظاهری رشد میسلیوم در جدول ۴-۸ ارائه شده است. این شاخص‌ها کیفی بوده و بر اساس مشاهده کیفیت رشدی میسلیوم در محیط‌های کشت متفاوت بدست آمده است.

علاوه بر جدول ۴-۸، نمونه‌ای از تصاویر ثبت شده برای انواع شاخص‌های کیفی میسلیوم قارچ‌های بومی نیز در شکل ۴-۷ ارائه شده است. این تصاویر در هماهنگی با انواع شاخص‌های کیفی میسلیوم تشریح شده در جدول ۴-۸ می‌باشد.

همانگونه که جدول ۴-۸ نشان می‌دهد، *Donika Pucherima* در محیط کشت عصاره کمپوست دارای میسلیوم چسبیده به کف پتری دیش (Appressed type) (اصطلاحا بدون میسلیوم هوایی) بود.تراکم میسلیومی این قارچ کم و همچنین بدون رنگ بود. این تیپ میسلیوم تاثیر منفی بر رشد میسلیوم در اسپاون و بستر کشت

Archive of SID

www.SID.ir

میوه‌دهی خواهد داشت. با وجود این، شکل هندسی رشدی میسلیوم در تمامی محیط‌های کشت از نوع منظم (به صورت تقریبا دایروی) بود که این موضوع یک مزیت برای یکنواختی میسلیوم در محیط کشت و یا اسپاون و حتی بستر میوه‌دهی محسوب می‌شود. در مجموع، بهترین ویژگی‌های میسلیومی این قارچ در دو محیط کشت PDA و MGA بدست آمد.

محیط کشت عصاره کمپوست در قارچ *Lenzites tricolor* میسلیوم بسیار کم تراکم و نازکی تولید کرد در حالیکه در سایر محیط‌های کشت، میسلیوم نسبتا متراکم و با رشد پنبه‌ای مشاهده شد. در تمامی محیط‌های کشت، رنگ میسلیوم سفید و شکل هندسی آن منظم بود. در این قارچ نیز، در مجموع، بهترین ویژگی‌های میسلیومی در دو محیط کشت PDA و MGA بدست آمد.

قارچ *Hohenbuehelia auriscapium* در محیط کشت عصاره کمپوست بهترین مشخصات رشدی را نشان داد از جمله رشد رشته‌ای (Strandy) که بهترین نوع رشد میسلیومی است، تراکم متوسط به بالا و شکل هندسی منظم میسلیومی. سایر محیط‌های کشت، شکل هندسی نامنظمی برای میسلیوم ایجاد کردند و به علاوه تراکم میسلیومی کمتر و نوع بافت پنبه‌ای (در مقایسه با رشته‌ای) تولید نمودند. اگرچه تمامی محیط‌های کشت موجب قرار گرفتن سرعت رشد شعاعی در کلاس بسیار کند شدند، اما نتایج آماری حاکی از پیشتازی محیط کشت عصاره کمپوست از سایر محیط‌های کشت در ارتباط با سرعت رشد شعاعی میسلیوم بود. لذا محیط کشت عصاره کمپوست بهترین محیط کشت پیشنهادی برای این قارچ می‌باشد.

قارچ *Ganoderma tsugae* در تمامی محیط‌های کشت مورد آزمایش سرعت رشدی متوسط و شکل هندسی رشد منظمی نشان داد. همچنین رنگ میسلیوم در همه انواع محیط کشت سفید بود. اما محیط کشت عصاره کمپوست موجب تولید بافت نازک میسلیومی با تراکمی کمتر از سایر محیط‌های کشت دیگر بود. لذا

Archive of SID

www.SID.ir

بهترین محیط‌های کشت برای این قارچ شامل PDA، MGA و YPG می‌باشند. نتایج مشابهی با گونه *Fomes fomentarius* بدست آمد. اما سرعت رشدی میسلیوم در محیط‌های کشت PDA، MGA و YPG در مقایسه با *Ganoderma tsugae* سریع بود.

قارچ *Lycopedron pyriforme* در محیط کشت عصاره کمپوست در مقایسه با سایر محیط‌های کشت بهترین شاخص‌های رشدی میسلیوم را نشان داد. در این محیط کشت، نوع بافت میسلیوم فرم رشته‌ای بود که فرم مرغوبی از نظر کاربرد صنعتی برای یک قارچ کلاهک‌دار می‌باشد. سرعت رشد میسلیوم در تمامی محیط‌های کشت مورد آزمایش کند یا بسیار کند بود. نتایج مشابهی با قارچ *Macrolepoita konradii* در محیط کشت عصاره کمپوست بدست آمد. میسلیوم این قارچ در سایر محیط‌های کشت از نظر هندسی به طور بسیار نامنظمی رشد کرد که از نظر کاربردی مطلوب نمی‌باشد. رنگ میسلیوم این قارچ در تمامی محیط‌های کشت سفید کرمی بود.

قارچ *Pholiota aurivella* از نظر بافت میسلیومی در محیط کشت عصاره کمپوست بهترین فرم یعنی رشته‌ای را نشان داد. اما تراکم میسلیومی کمتری در این محیط کشت در مقایسه با سایر محیط‌های کشت دیده شد. با در نظر گرفتن تراکم میسلیومی، دو محیط کشت MGA و YPG بهترین محیط کشت بودند.

در قارچ *Hypholma fasciculare* بهترین بافت میسلیومی (رشته‌ای) در محیط کشت YPG مشاهده شد اما با در نظر گرفتن تراکم میسلیومی، محیط کشت PDA بهترین محیط کشت بود.

Archive of SID

www.SID.ir

در تصاویر ۴-۷ (الف)، در ردیف بالا گونه *Ganoderma tsugae* در محیط کشت عصاره کمپوست (CEA) (تصویر سمت راست) در مقایسه با سایر محیط‌های کشت (MGA, PDA, YPG) میسلیوم نازک با تراکم کمی تولید کرده است. نتایج مشابهی با گونه *Fomes fomentarius* بدست آمد (ردیف پایین).

در تصاویر۴-۷ (ب)، در ردیف بالا، گونه *Donika Pucherima* در محیط کشت عصاره کمپوست (CEA) (تصویر سمت راست) دارای میسلیوم چسبیده به کف پتری دیش (Appressed type) (اصطلاحا بدون میسلیوم هوایی)، تراکم کم و سرعت رشد خیلی کند و همچنین بدون رنگ بود. در ردیف پایین، گونه قارچ *Lycopedron pyriforme* در محیط کشت عصاره کمپوست (CEA) در مقایسه با سایر محیط‌های کشت (MGA, PDA, YPG) دارای میسلیوم فرم رشته‌ای بود که فرم مرغوبی می‌باشد.

۴-۴-۱-۲- تولید اسپاون (سری الف)

با توجه به وضعیت رشد رویشی میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون، مشخص گردید که اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌های *Lenzites tricolor*، *Ganoderma tsugae* و *Fomes fomentarius* طی ۱۴ الی ۱۵ روز به طور کامل آماده شد. از سوی دیگر، اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌های *Pholiota aurivella*، *Macrolepoita konradii*، *Hypholma fasciculare* و *Lycopedron pyriforme* به ترتیب طی ۱۹، ۲۳، ۲۵ و ۲۷ روز آماده شدند. اما برای دو گونه *Donika pulcherima* و *Hohenbuehelia auriscapium* هیچگونه رشدی در اسپاون دانه‌های گندم مشاهده نگردید (شکل ۴-۸). همچنین تلاش برای بررسی امکان رشد این دو گونه در اسپاون مبتنی بر خاک اره یا انواع دیگر اسپاون به نتیجه نرسید.

Archive of SID

www.SID.ir

در تصاویر ۴-۸ (الف)، اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌های *Ganoderma tsugae* و *Fomes fomentarius* طی ۱۴ الی ۱۵ روز به طور کامل آماده شد. اما اسپاون گونه *Donika pulcherima* هیچ گونه رشدی در طی یک ماه انکوباتور گذاری در اسپاون نشان نداد. در تصاویر ۴-۸ (ب)، اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌ی *Lenzites tricolor*، طی ۱۴ الی ۱۵ روز به طور کامل آماده شد، درحالیکه اسپاون *Hypholma fasciculare* به ۲۵ روز زمان برای پر شدن نیاز داشت. اما *Hohenbuehelia auriscapium* هیچگونه رشدی در اسپاون دانه‌های گندم در طی یک ماه انکوباتور گذاری در اسپاون نشان نداد. در تصاویر ۴-۸ (پ)، اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌های *Pholiota aurivella*، *Macrolepoita konradii*، و *Lycopedron pyriforme* به ترتیب طی ۱۹، ۲۳ و ۲۷ روز آماده شد.

۴-۴-۱-۳- کشت معلق **میسلیوم (سری الف)**

کشت‌های تعلیقی جدایه‌های سری الف در حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر در انکوباتور شیکردار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از خروج ارلن از انکوباتور، مشاهدات نشان داد سریعترین رشد میسلیومی (از نظر پر کردن محیط مایع) مربوط به گونه‌های *Fomes fomentarius*، *Lenzites tricolor*، *Pholiota aurivella*، و *Hypholoma fasciculare* و کندترین مربوط به گونه‌های *Macrolepiota konradii*، *Ganoderma tsugae*، *Lycoperdon pyriforme*، *Donkia pulcherrima* و *Hohenbuehelia auriscalpium* بود. رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف قارچ، متفاوت بود. برخی از آن‌ها به طور یکنواخت و متراکم سراسر محیط کشت مایع را پر کرد و در حالی که رشد میسلیوم برخی گونه‌ها به صورت پراکنده و کم تراکم بود. پس از پایان بررسی و مشاهدات، محیط مایع کشت از طریق کاغذ صافی استریل حذف و میسلیوم‌ها از روی کاغذ صافی در شرایط استریل جمع

Archive of SID

www.SID.ir

آوری و در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه‌سانتیگراد خشک شدند. در انتها وزن میسلیوم خالص محاسبه گردید و جدایه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. وزن میسلیوم خالص در حجم ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، بین ۴/۷۰ گرم تا ۱۷/۷۰ گرم متغیر بود. کمترین توده میسلیومی مربوط به گونه *Hohenbuehelia auriscalpium* (۴/۷۰ گرم) و بیشترین وزن توده میسلیومی مربوط به گونه *Pholiota aurivella* (۱۷/۷۰ گرم) بود ($p < 0.05$) (شکل ۴-۶).

شکل ۴- ۶- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه‌های قارچ بومی (سری الف)

Archive of SID
www.SID.ir

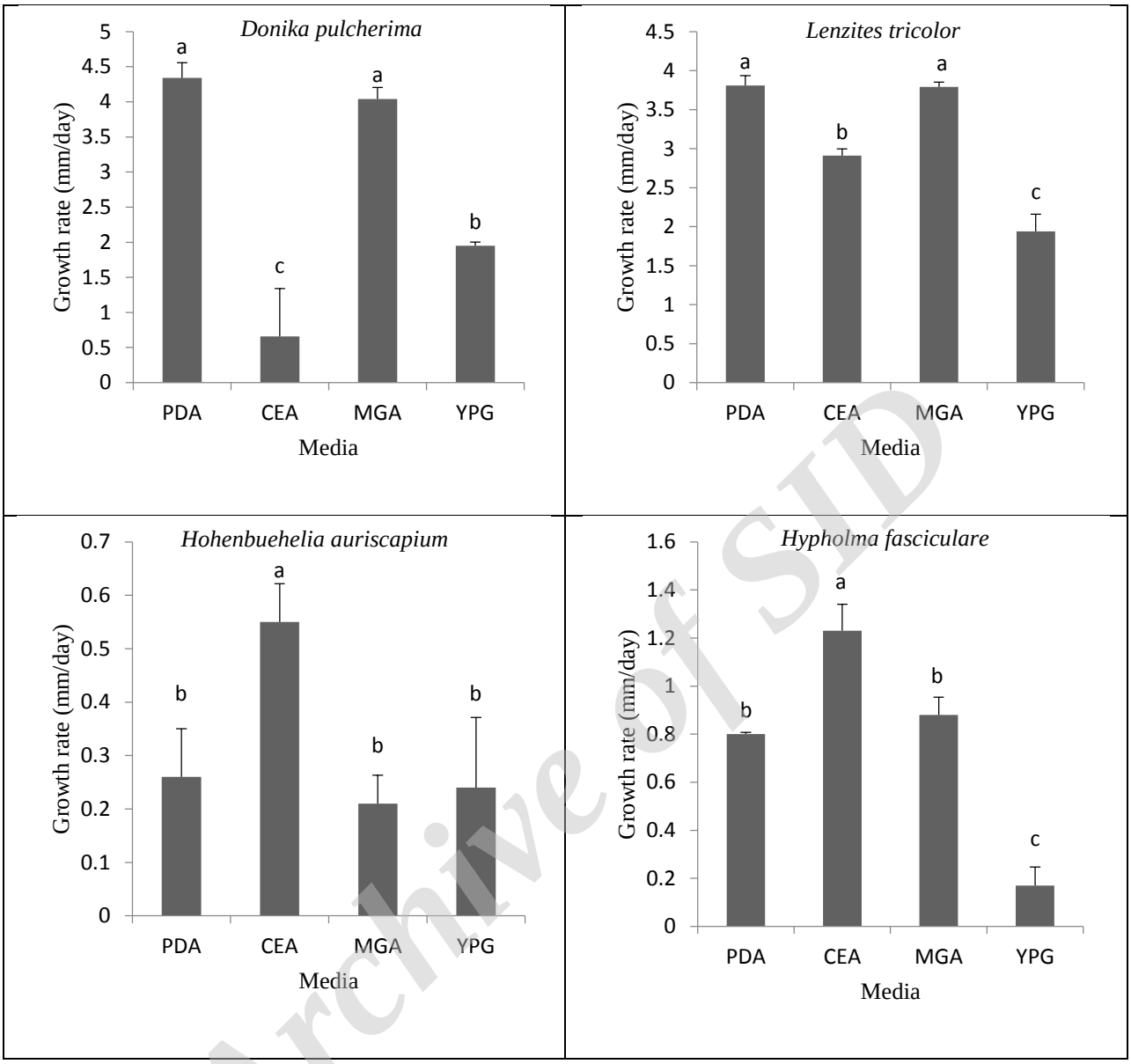
جدول ۴-۷- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۹ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت(سری الف)

منبع تغییرات	درجه آزادی	گونه قارچ								
		Donika Pucherima	*Lenzites tricolor*	*Hohenbuehelia auriscapium*	*Ganoderma tsugae*	*Fomes fomentarius*	*Lycopedron pyriforme*	*Macrolepoita konradii*	*Pholiota aurivella*	*Hypholma fasciculare*
محیط کشت	۳	۹/۱۹۱**	۲/۳۵۵**	۰/۰۷۴**	۰/۰۳۲۸^{ns}	۰/۶۰^{ns}	۰/۱۹۶^{ns}	۰/۲۵۴^{ns}	۰/۱۷۶^{ns}	۰/۵۷۴ **
خطا	۸	۰/۱۳۵	۰/۰۱۸	۰/۰۰۸	۰/۱۴۱	۰/۱۶۵	۰/۸۳	۰/۰۶۳	۰/۰۶۶	۰/۰۰۵

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

Archive of SID

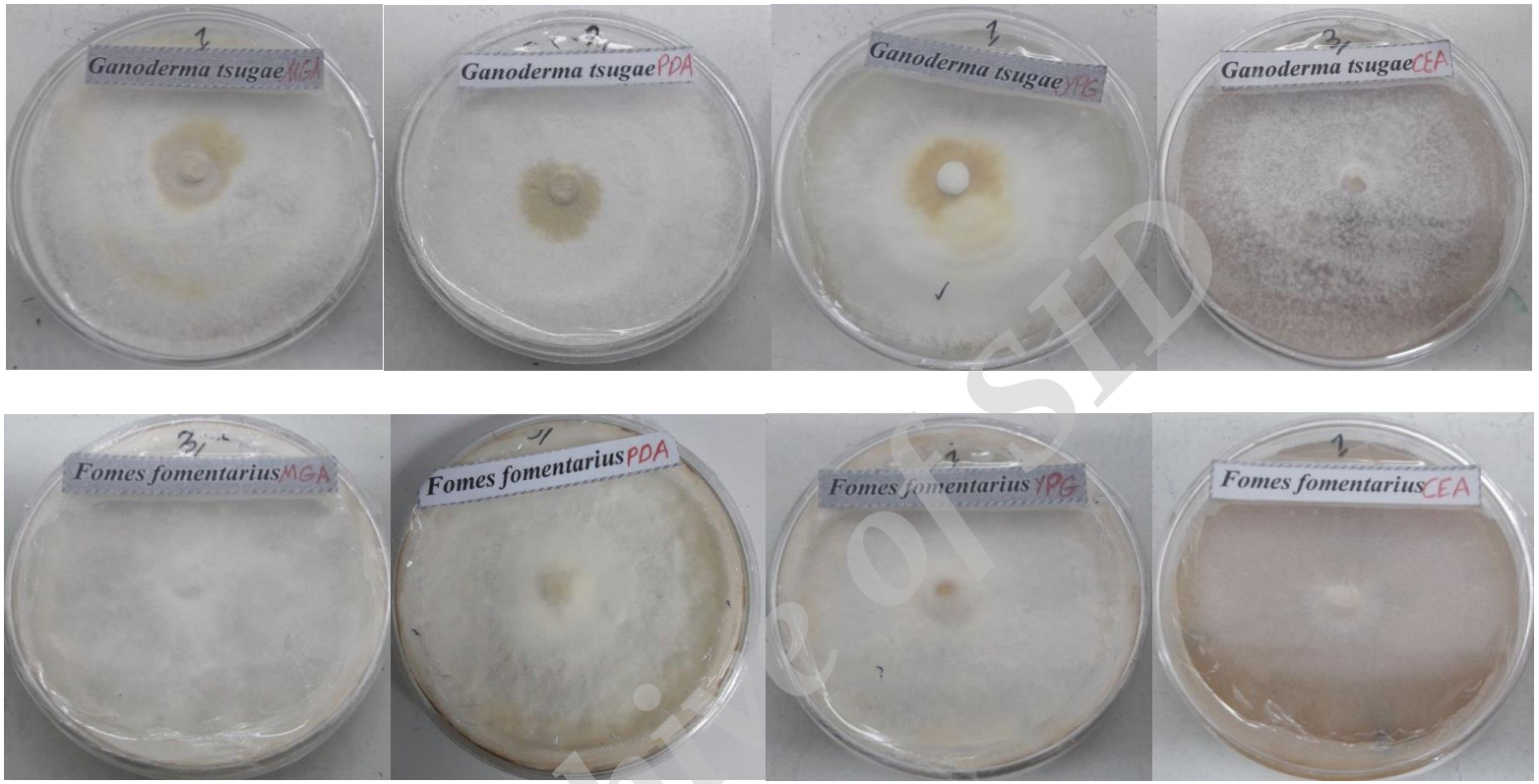
www.SID.ir



شکل ۴-۶- (مکرر) نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری الـف) (در ۴ گونه قارچی که تفاوت معنی‌داری نشان دادند)

Archive of SID

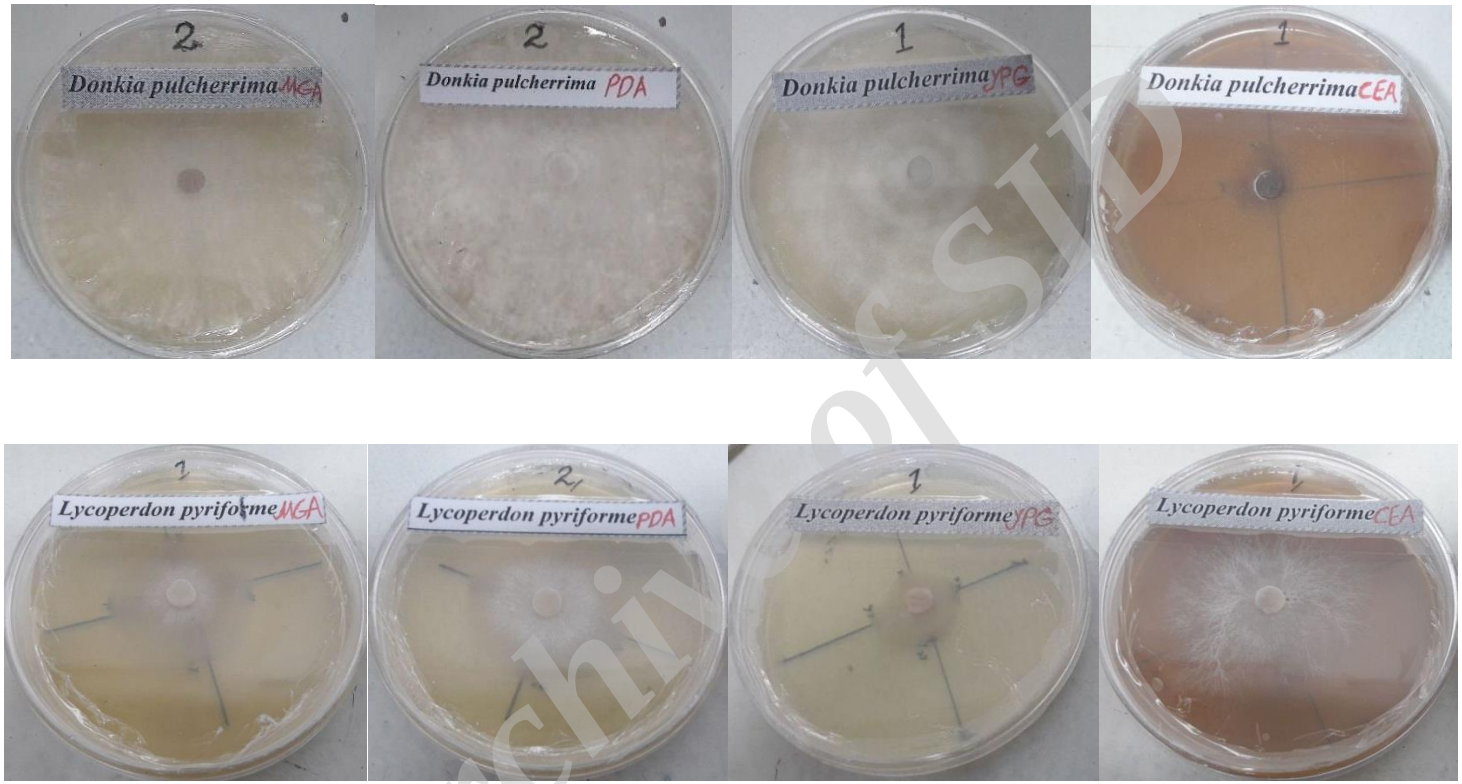
www.SID.ir



شکل ۴-۷ (الف)- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری الف)

Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۷ (ب)- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف(سری الف)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۸- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۹ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت(سری الف)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Donika pulcherima	PDA	کرکی	۴	سفید کرمی	منظم
	CEA	بدون میسلیوم هوایی	۳	بدون رنگ	منظم
	MGA	کرکی	۴	سفید کرمی	منظم
	YPG	کرکی	۴	سفید	منظم
Lenzites tricolor	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای خیلی نازک	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Hohenbuehelia auriscapium	PDA	پنبه‌ای	۴	سفید	نامنظم
	CEA	رشته‌ای پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۴	سفید	نامنظم
	YPG	پنبه‌ای	۴	سفید	نامنظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۸- شاخصه های رشدی بررسی شده ۹ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت(سری الف)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Fomes fomentarius	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید مایل به کرمی	منظم
	CEA	رشته‌ای کرکی	۴	سفید مایل به نارنجی	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Lycopedron pyriforme	PDA	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۴	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای کم	۳	سفید	منظم
	YPG	بدون میسلیوم هوایی	۳	کرمی	منظم
Macrolepoita konradii	PDA	کرکی	۲	سفید کرمی	نامنظم (یکطرفه)
	CEA	رشته‌ای کرکی	۴	سفید کرمی	کمی نامنظم
	MGA	کرکی	۲	سفید کرمی	نامنظم (یکطرفه)
	YPG	کرکی	۲	سفید کرمی	نامنظم (یکطرفه)

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۸- شاخصه های رشدی بررسی شده ۹ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت(سری الف)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Pholiota aurivella	PDA	پنبه‌ای	۴	سفید مایل به زرد	منظم
	CEA	رشته‌ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید مایل به زرد	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید مایل به زرد	منظم
Hypholma fasciculare	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید کرمی	منظم
	CEA	پنبه‌ای کم	۵	سفید کرمی	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید کرمی	منظم
	YPG	رشته‌ای	۴	سفید کرمی	منظم
Ganoderma tsugae	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	پنبه‌ای کرکی، میسلیوم‌ها نازک	۴	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۸ (الف)- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپاون دانه‌های گندم. (سری الف)

www.SID.ir

ادامه شکل ۴-۸ (ب)- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپاون دانه‌های گندم. (سری الف)

www.SID.ir

ادامه شکل ۴-۸ (پ)- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپاون دانه‌های گندم. (سری الف)

Archive of SID
www.SID.ir

۴- ۴-۲- زراعی‌سازی سری ب (۱۰ نمونه)

۴-۴-۲-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری ب)

الف: سرعت رشد شعاعی میسلیوم

با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴-۹) مشخص گردید که محیط کشت اثر معنی‌داری بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم جنس‌های *Marasmiellus sp.*، *Trametes sp.*، *Cyclocybe sp.*، *Dadalopsis sp.*، *Ganoderma sp.*، *Leucoagaricus sp.* و *Armillaria sp.* در سطح کمتر از ۰/۰۱ درصد دارد. لذا نمودارهای تغییرات سرعت رشد شعاعی (شکل ۴-۱۰) و جدول مقایسه میانگین برای این نمونه‌ها ترسیم شد (جدول ۴-۱۷).

جدول ۴-۹- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Marasmiellus sp.*	*Trametes sp.*	*Trametes sp.*	*Cyclocybe sp.*	*Daedaleopsis sp.*
محیط کشت	۸	۲/۴۳۶**	۴/۴۱۵**	۶/۲۳۴**	۱/۵۴۶**	۳/۷۴۱**
خطا	۳	۰/۰۲۵	۰/۳۰۹	۰/۲۵۰	۰/۰۰۷	۰/۰۱۷

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۴-۹- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Ganoderma sp*	*Trametes* sp.	*Trametes sp.*	*Leucoagaricus sp.*	*Armillaria sp.*
محیط کشت	۸	۵/۲۷**	۱۳/۱۸۶^{ns}	۶/۶۴۷**	۱/۳۸۳**	۰/۰۹۰**
خطا	۳	۰/۰۶۶	۵/۶۵۷	۰/۰۳۶	۰/۰۱۵	۰/۰۰۴

Archive of SID

www.SID.ir

در جنس *Marasmiellus sp.*، سه محیط کشت PDA، CEA، MGA بهترین محیط کشت بودند و موجب رشد سریع (بین ۳ تا ۴ میلیمتر در روز) میسلیوم شدند. اما محیط کشت YPG موجب رشد کند (بین ۱ تا ۲ میلی‌متر در روز) میسلیوم این قارچ شد. جنس *Cyclocybe sp.* نیز پاسخ رشدی متفاوتی به محیط کشت‌های مختلف نشان داد. در دو محیط کشت PDA و MGA سرعت رشد میسلیوم متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) ثبت شد. نسبت به سایر محیط کشت‌ها، محیط کشت CEA بیشترین سرعت رشد شعاعی میسلیوم را به خود اختصاص داد (۳ الی ۴ میلیمتر در روز). محیط کشت YPG همانند جنس *Marasmiellus sp* موجب رشد کند میسلیوم قارچ گردید.

در جنس *Trametes sp.* سه محیط کشت PDA، CEA و MGA موجب رشد سریع و خیلی سریع میسلیوم قارچ شدند و تنها محیط کشت YPG موجب رشد کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) میسیلوم قارچ شد. سرعت رشد شعاعی میسلیوم در جنس *Daedaleopsis sp.* در محیط کشت‌های مختلف مورد استفاده در آزمایش نیز متفاوت بود؛ به این صورت که دو محیط کشت PDA و MGA منجر به سرعت رشد سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) میسیلوم شدند. در محیط کشت CEA سرعت رشد میسلیوم به ۲ الی ۳ میلیمتر در روز (متوسط) کاهش یافت. در محیط کشت YPG همانند جنس‌های قبلی سرعت رشد پایین بوده و در کلاس رشدی خیلی کند (کمتر از ۱ میلیمتر در روز) قرار گرفت. سه محیط کشت PDA، CEA و MGA منجر به رشد متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) میسیلوم در جنس *Ganoderma sp.* شدند. در مقابل محیط کشت YPG نتوانست منجر به رشد بیشتر از ۱ میلیمتر در روز شده و از اینرو در کلاس رشدی خیلی کند قرار گرفت.

بهترین محیط کشت در جنس *Leucoagaricus sp.*، CEA (عصاره کمپوست) بود، سایر محیط-کشت‌ها منجر به کاهش سرعت رشد میسیلوم شدند؛ به این صورت که محیط کشت PDA و MGA در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) و محیط کشت YPG در کلاس رشدی خیلی کند (کمتر از ۱

Archive of SID

www.SID.ir

میلیمتر در روز) قرار گرفتند. در جنس *Armillaria sp.* سرعت رشد میسلیوم در تمامی محیط‌کشت‌های مورد استفاده در آزمایش کمتر از ۱ میلیمتر در روز (خیلی کند) بود.

ب) شاخص‌های رشدی کیفی میسلیوم

مجموعه شاخص‌های رشدی کیفی میسلیوم ۱۰ جدایه قارچ بومی از جمله رنگ، بافت، تراکم و شکل ظاهری رشد میسلیوم در جدول ۴-۱۲ ارائه شده است. تصاویر مربوط به رشد قارچ‌ها در محیط کشت‌های مختلف در شکل ۴-۱۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول ۴-۱۲ مشخص می‌شود که در جنس *Marasmiellus sp.* رنگ میسلیوم در تمامی محیط‌های کشت سفید بود. بافت میسلیوم در سه محیط کشت PDA، MGA و YPG، به صورت پنبه‌ای و در محیط کشت CEA به صورت کرکی بود. تراکم میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA خیلی زیاد، در محیط کشت YPG، زیاد و در محیط کشت CEA، کم بود. میسیلوم این قارچ در تمامی محیط‌های کشت به صورت منظم رشد کرد..

دو محیط کشت PDA و MGA با بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم خیلی زیاد، رنگ سفید، سرعت رشد متوسط و شکل رشدی منظم، محیط کشت مناسبی جهت رشد میسلیوم جنس *cyclocybe sp.* می‌باشند. در محیط کشت CEA سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی سریع قرار گرفت و شکل رشدی میسلیوم منظم و رنگ آن سفید بود، همچنین بافت آن به صورت رشته‌ای بود، اما تراکم میسلیوم در این محیط کشت کم بود. در محیط کشت YPG با توجه به سرعت رشد پایین میسلیوم، اگر چه که سایر شاخص‌های رشدی در بهترین ویژگی‌های رشدی میسلیوم قرارمی‌گیرند، اما سرعت رشد در این محیط کشت در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار می‌گیرد. در قارچ *Deadelopsis sp.* دو محیط کشت PDA و MGA دارای بافت پنبه‌ای نمدی، تراکم خیلی زیاد میسلیوم، سفید رنگ و سرعت رشدی سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) میسلیوم بودند، که نسبت به دو محیط کشت دیگر ویژگی‌های رشدی بهتری را نشان دادند. در

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت YPG سرعت رشدی میسلیوم در کلاس رشدی خیلی کند قرار گرفت. همچنین در محیط کشت CEA میسلیوم به صورت کرکی خیلی کم میسلیوم، تراکم خیلی کم و سرعت رشدی متوسط، رشد کرد.

در جنس *Ganoderma sp.* سه محیط کشت PDA، CEA و MGA میسلیوم سفید رنگ، سرعت رشد متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) و روند رشدی منظمی نشان داد، اما تراکم میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA خیلی زیاد با بافت پنبه‌ای رشته‌ای و CEA با تراکم خیلی کم و بافت رشته‌ای بود. دو محیط کشت PDA و MGA در جنس *Leucoagaricus sp.* منجر به بافت پنبه‌ای رشته‌ای میسلیوم، تراکم زیاد، و سرعت رشد کند (۱ الی ۲ میلیمتر) میسلیوم شدند. محیط کشت CEA منجر به بافت رشته‌ای میسلیوم، تراکم کم و سرعت رشد متوسط میسیلوم گردید. همچنین در محیط کشت YPG میسلیوم دارای بافت کرکی، تراکم کم و سرعت رشد خیلی کند بود. در تمامی محیط کشت‌ها رنگ میسلیوم سفیدرنگ و روند رشدی به صورت منظم بود.

در جدایه‌های ارسال شده در این سری، ۴ نمونه متعلق به جنس *Trametes sp.* بودند. در هر چهار جنس محیط کشت PDA منجر به رشد خیلی سریع میسلیوم، با بافت پنبه‌ای و تراکم خیلی زیاد و زیاد میسلیوم گردید. در جنس *Armillaria sp* مشخص گردید که این قارچ در سه محیط کشت MGA، PDA، CEA تولید ریزومورف می‌کند. تولید ریزومورف در محیط کشت MGA نسبت به سایر محیط کشت‌ها بیشتر بود. تراکم میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها زیاد بود. با توجه به نتایج مشخص گردید که ادر ابتدا در این قارچ تولید میسلیوم انجام می‌شود اما پس از تولید ریزومورف از تولید میسلیوم در این قارچ کاسته می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۴-۲-۲- رشد اسپاون (سری ب)

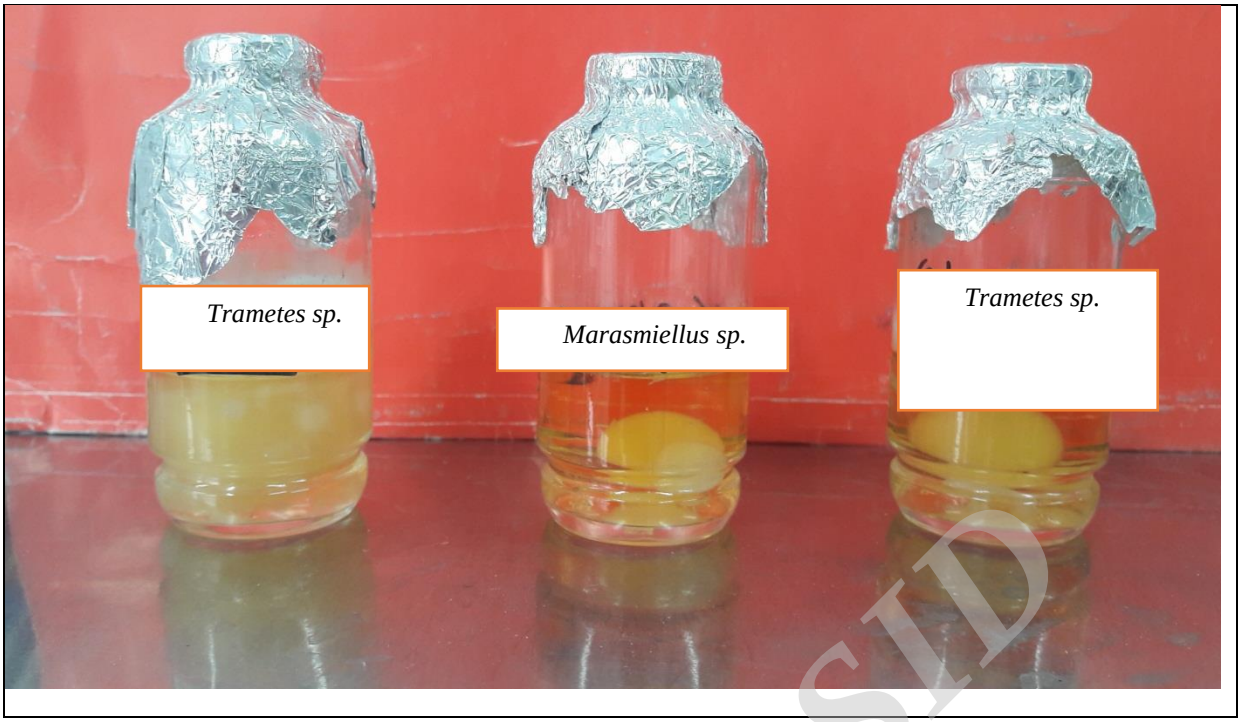
با توجه به وضعیت رشد رویشی در میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون، مشخص گردید که در تمامی جدایه‌های قارچ بومی اسپاون دانه‌های گندم به طور کامل آماده شدند (شکل ۴-۱۲).

۴-۴-۲-۳- کشت معلق میسلیوم (سری ب)

کشت‌های تعلیقی جدایه‌های سری ب در حجم ۴۰ میلی‌لیتر در انکوباتور شیکردار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از خروج ویال‌ها از انکوباتور، مشاهدات نشان داد سریعترین رشد میسلیومی (از نظر پر کردن محیط مایع) مربوط به گونه‌های *Trametes sp*، *Daedaleopsis sp*، *Trametes sp*، *Trametes sp*، *Marasmiellus sp* و *Trametes sp* و کندترین مربوط به *Leucoagaricus sp*، *Armillaria sp*، *Ganoderma sp* و *Cyclocybe sp* بود. رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف قارچ، متفاوت بود. در برخی از آن‌ها میسلیوم به طور یکنواخت و متراکم سراسر محیط کشت مایع را پر کرد و در حالی که رشد میسلیوم برخی گونه‌ها به صورت پراکنده و کم تراکم بود. پس از پایان بررسی و مشاهدات، محیط مایع کشت از طریق کاغذ صافی استریل حذف و میسلیوم‌ها از روی کاغذ صافی در شرایط استریل جمع آوری و در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه‌سانتیگراد خشک شدند. در انتها وزن میسلیوم خالص محاسبه گردید و جدایه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. وزن میسلیوم خالص در حجم ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، بین ۱/۷۰ گرم تا ۷/۹۵ گرم متغیر بود. کمترین توده میسلیومی مربوط به گونه *Leucoagaricus sp* (۱/۷۰ گرم) و بیشترین وزن توده میسلیومی مربوط به گونه *Trametes sp* (۷/۹۵ گرم) بود ($p < 0.05$) (شکل ۴-۹).

Archive of SID

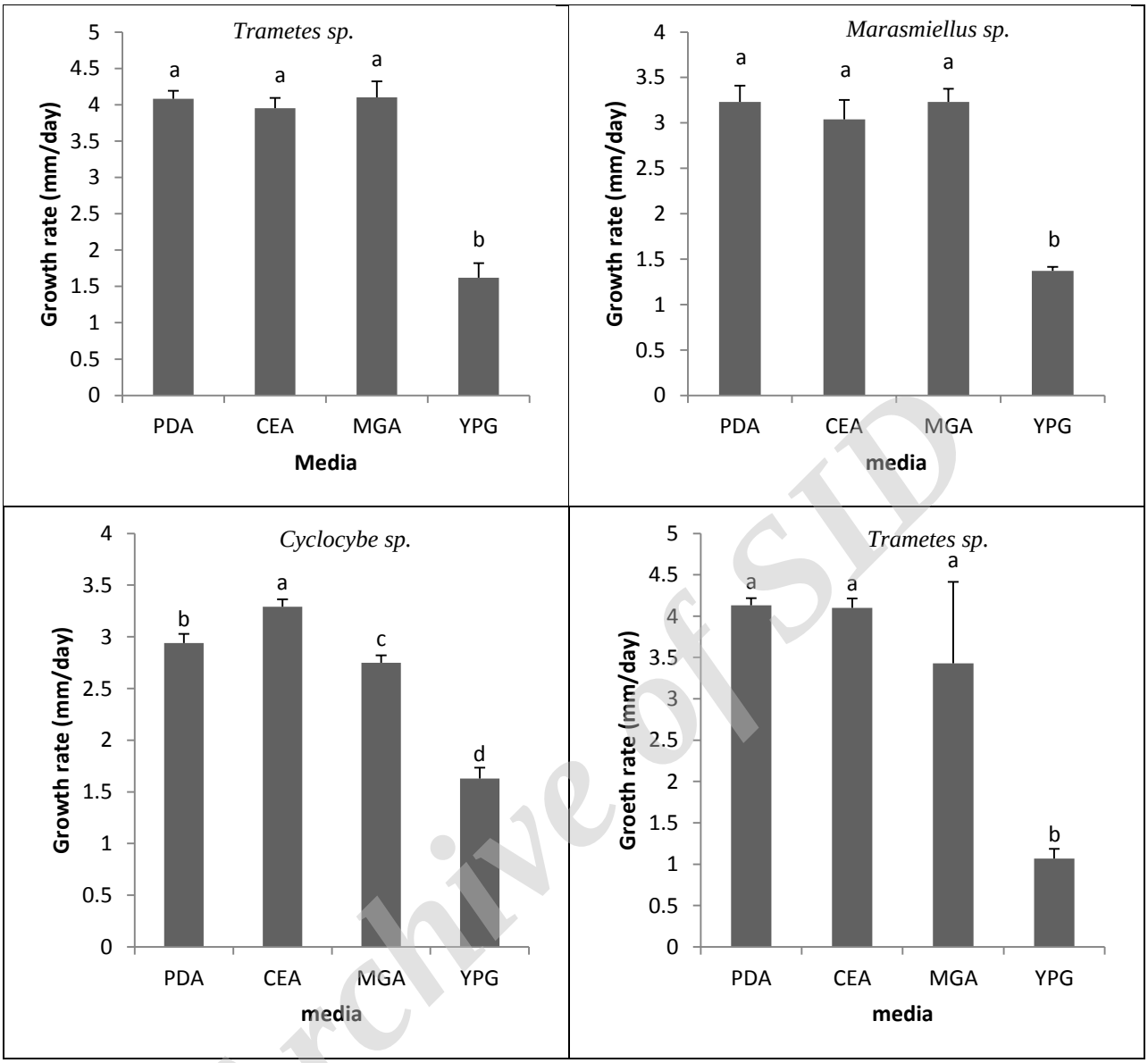
www.SID.ir



شکل ۴- ۹- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه‌های قارچ بومی (سری ب)

Archive of SID

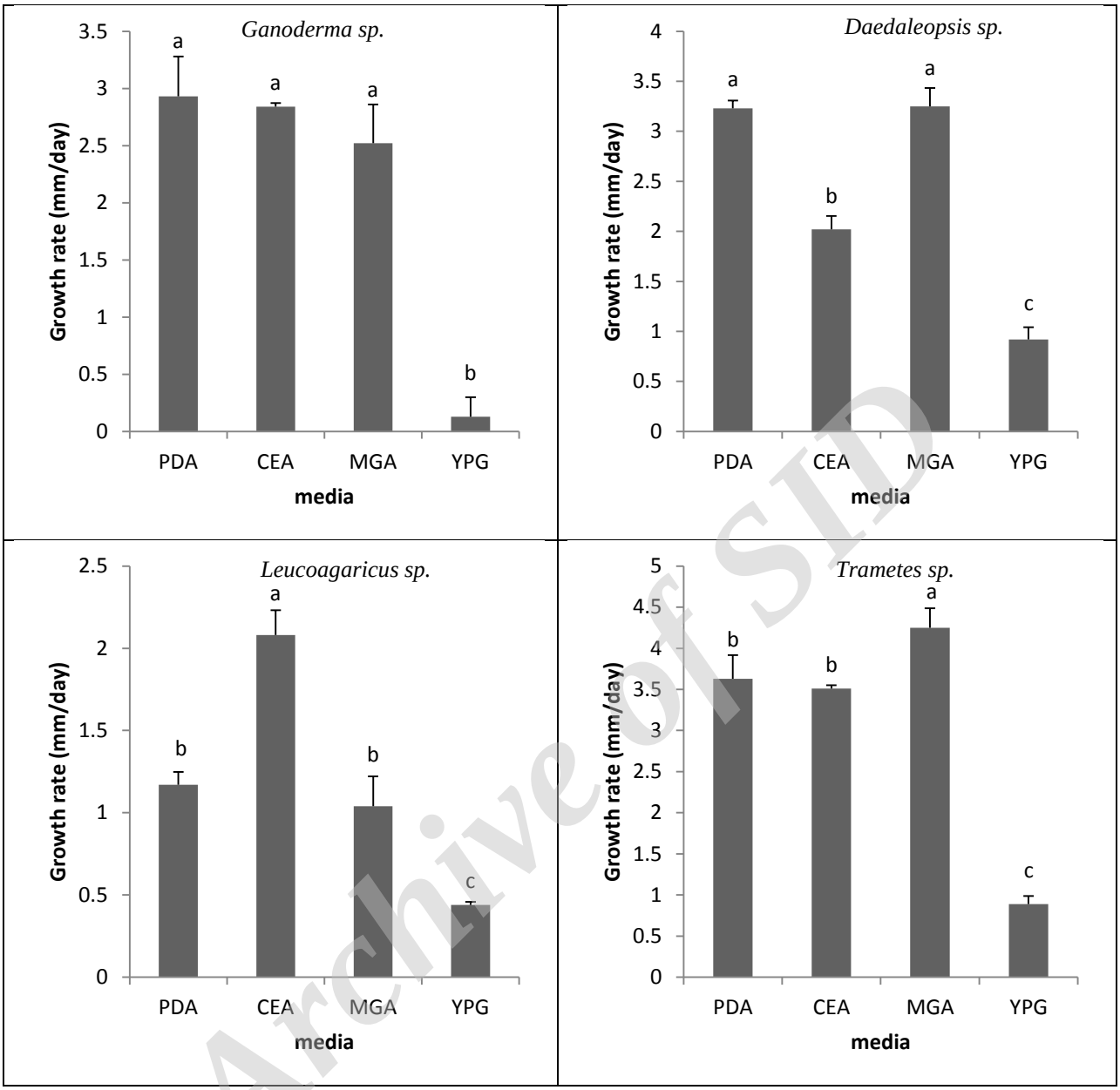
www.SID.ir



شکل ۴-۱۰- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

Archive of SID

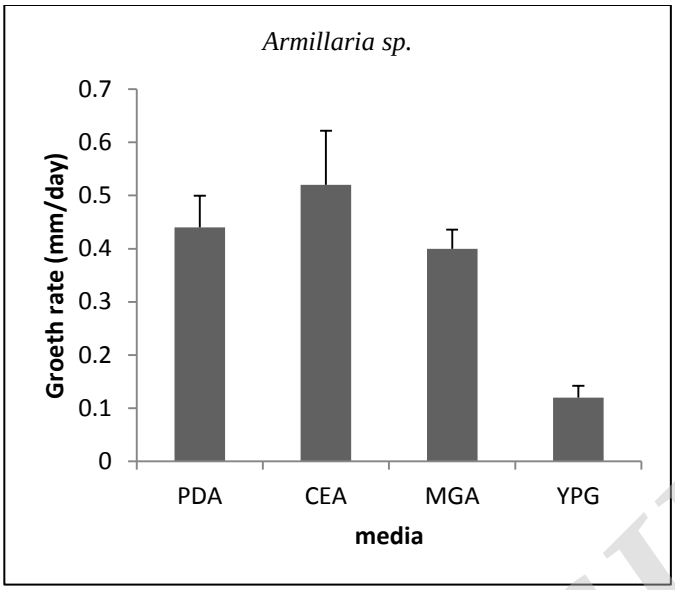
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۰- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

Archive of SID

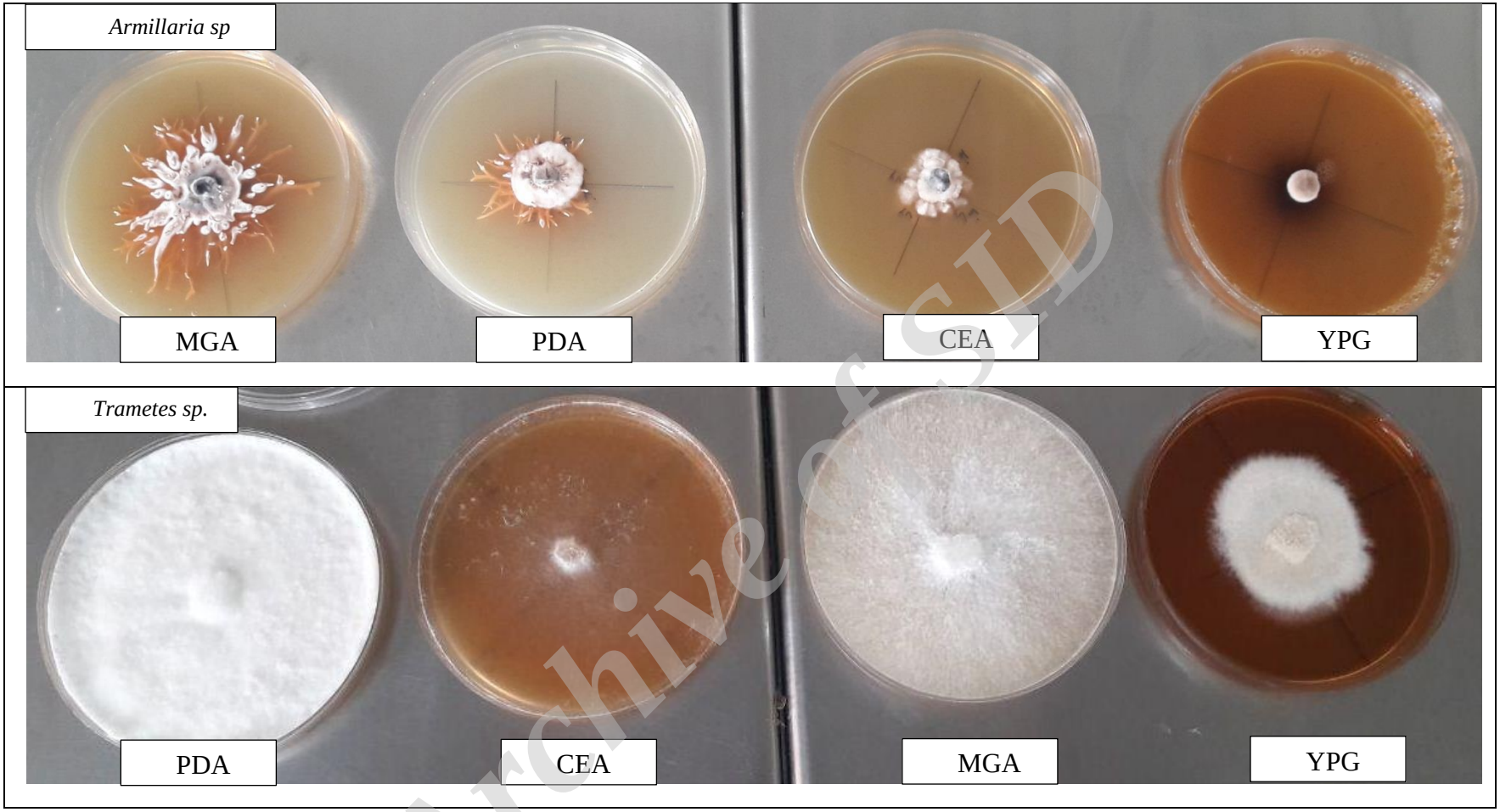
www.SID.ir



ادامه شکل۴-۱۰- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف(سری ب)

Archive of SID

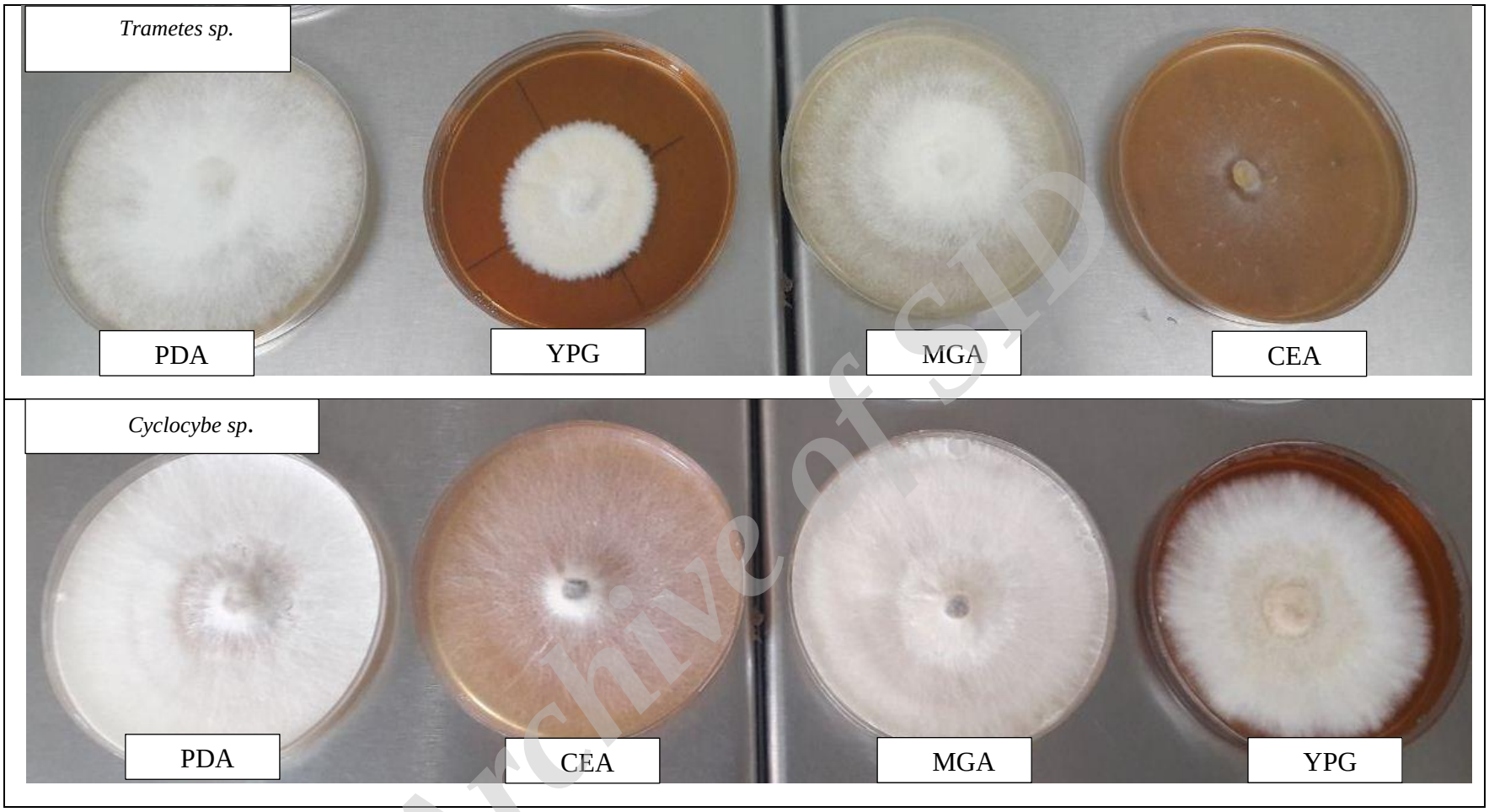
www.SID.ir



شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

Archive of SID

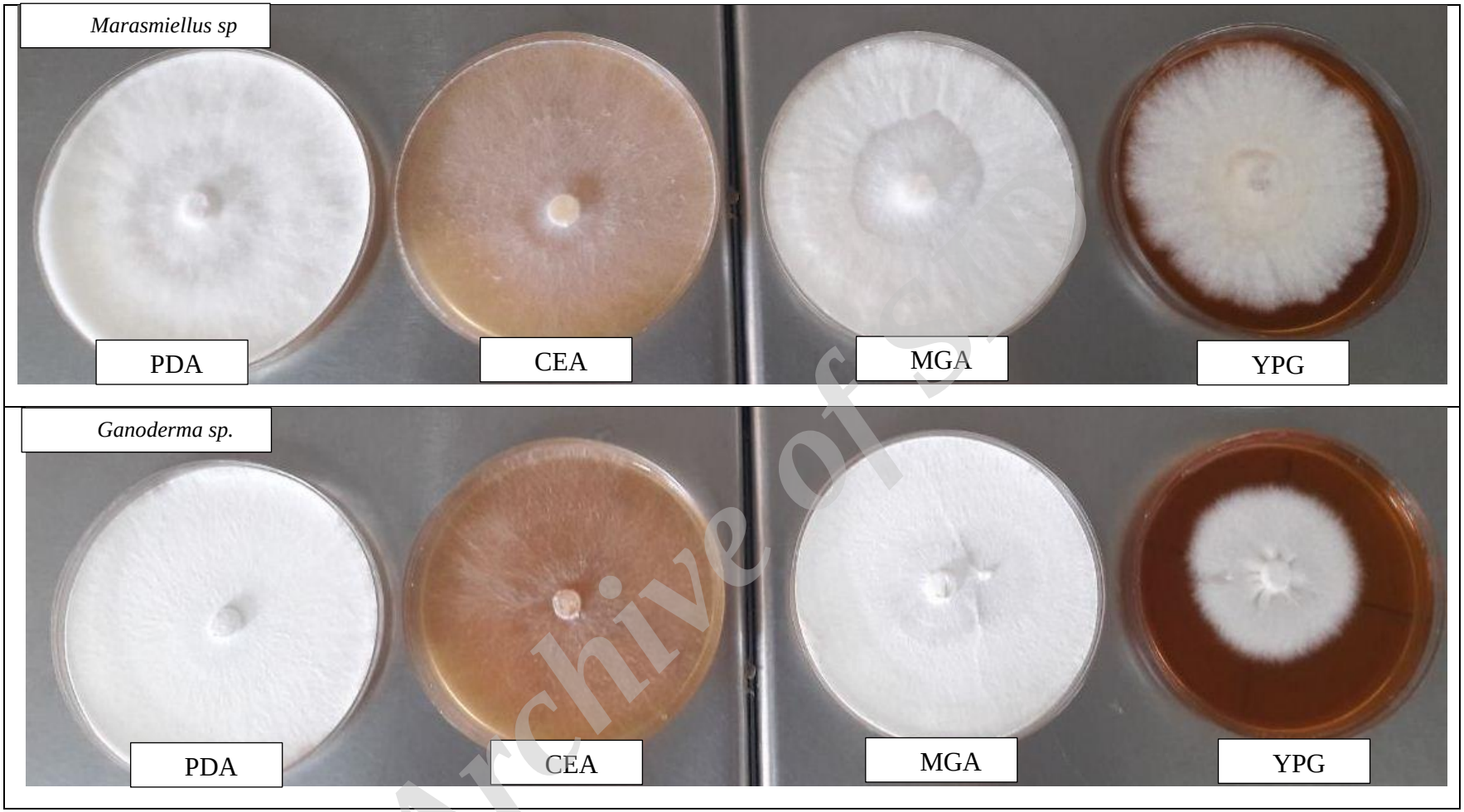
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

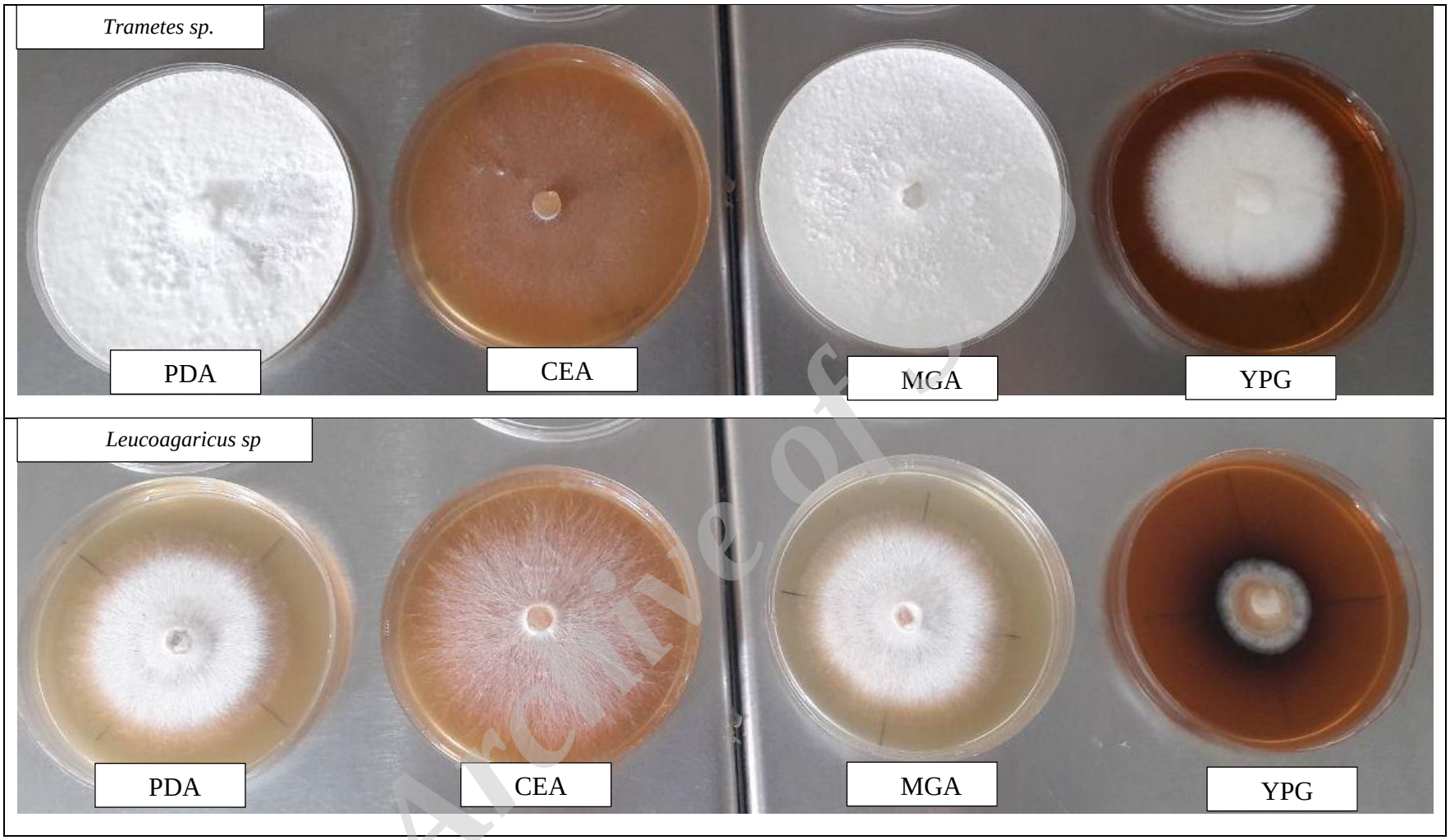
Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

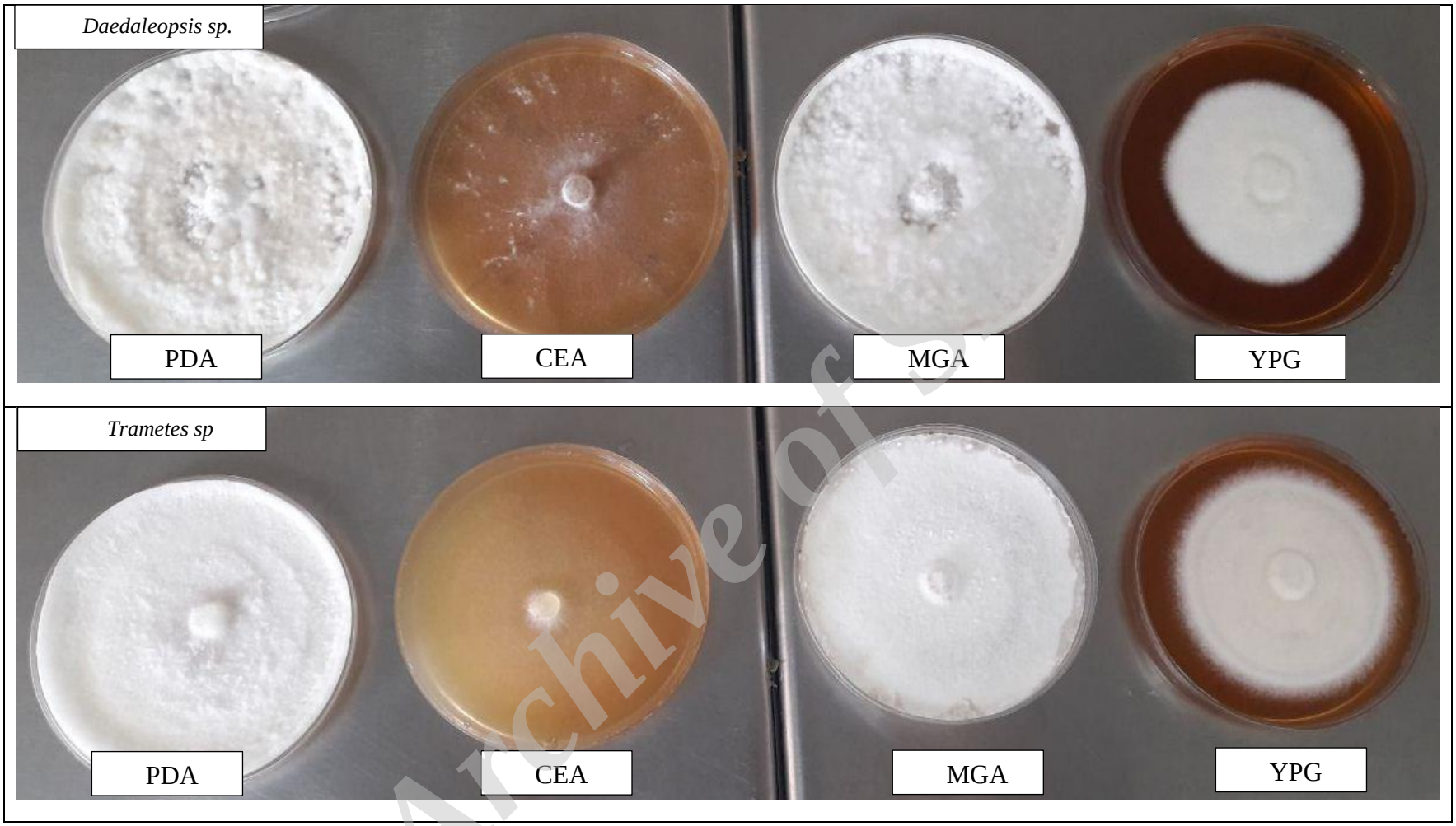
Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۱- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ب)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۱۰- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Marasmiellus sp.	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای خیلی کم میسلیوم	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۲	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	کرکی خیلی کم میسلیوم	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۶	سفید	نا منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۰- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Cyclocybe sp.	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Daedaleopsis sp.	PDA	پنبه‌ای نمدی	۶	سفید	منظم
	CEA	کرکی خیلی کم میسلیوم	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای نمدی	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Ganoderma sp.	PDA	پنبه‌ای رشته‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای رشته‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	رشته‌ای کرکی	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۰- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	کرکی کم میسلیوم	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	CEA	کرکی خیلی کم میسلیوم	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۶	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
Leucoagaricus sp.	PDA	رشته‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۳	سفید	منظم
	MGA	رشته‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	کرکی	۳	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول۴-۱۰- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۰ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ب)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم**	رنگ	روند رشد (شکل رشد)
Armillaria sp.	PDA	پنبه‌ای دارای ریزومورف	۵ (ریزومورف متوسط)	سفید (ریزومورف قهوه‌ای)	منظم
	CEA	پنبه‌ای دارای ریزومورف	۵ (ریزومورف کمتر)	سفید (ریزومورف قهوه‌ای)	نامنظم
	MGA	پنبه‌ای دارای ریزومورف	۵ (ریزومورف قوی‌تر)	سفید (ریزومورف قهوه‌ای)	نامنظم
	YPG	پنبه‌ای بدون ریزومورف	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۱۲- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه‌های گندم (سری ب)

www.SID.ir

ادامه شکل ۴-۱۲- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه‌های گندم (سری ب)

Archive of SID
www.SID.ir

Cyclocybe sp

Leucoagaricus sp

Marasmiellus sp.

ادامه شکل ۴-۱۲- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه‌های گندم (سری ب)

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۴-۳- زراعی‌سازی سری ج (۱۲ نمونه)

۴-۴-۳-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری ج)

الف – سرعت رشد شعاعی میسلیوم

با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴-۱۱) مشخص گردید که در تمامی ۱۲ جدایه قارچ بومی، تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌ها از نظر تاثیر بر سرعت شعاعی میسلیوم در سطوح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۱ درصد وجود داشت. لذا نمودارهای تغییرات سرعت رشد شعاعی در اثر انواع محیط کشت برای این قارچ‌ها ترسیم شد (شکل ۴-۱۴). همچنین جدول مقایسه میانگین برای این نمونه‌ها ترسیم شد (جدول ۴-۱۷).

جدول ۴-۱۱- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ج)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Hydnopolyporus fimbriatus*	*Trametes gibbosa*	*Pestalotiopsis versicolor*	*Psathyrella candolleana*	*Pestalotiopsis versicolor*	*Trametes gibbosa*	*Coprinellus disseminatus*
محیط کشت	۳	۳/۳۵۸**	۷/۷۱۶**	۰/۸۳۶**	۱/۳۱۳**	۰/۰۰۶**	۶/۸۵۴**	۵/۹۸۴**
خطا	۸	۰/۰۰۸	۰/۰۲۰	۰/۰۱۱	۰/۰۲۴	۰/۴۲۷	۰/۸۲۰	۰/۰۱۸

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۴-۱۱- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ج)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Paraconiothyrium brasiliense*	*Trametes versicolor*	*Xylariaceae sp.*	*Neopestalotiopsis sp.*	*Hypholoma sp.*
محیط کشت	۳	۱/۹۴۹**	۱۰/۲۱۵**	۰/۹۷۳**	۶/۴۶۹**	۱/۴۷۲**
خطا	۸	۰/۰۰۳	۰/۰۳۱	۰/۰۰۷	۰/۱۷۷	۰/۰۹۳

Archive of SID

www.SID.ir

در قارچ *Paraconiothyrium brasiliense* دو محیط کشت PDA و MGA منجر به رشد متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) میسلیوم شدند، این در حالیست که محیط کشت YPG در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت. محیط کشت عصاره کمپوست منجر به رشد سریع میسلیوم گردید. در قارچ *Coprinellus disseminatus* با توجه به نتایج مقایسه میانگین مشخص گردید که دو محیط کشت PDA و MGA در کلاس رشدی متوسط (۲الی ۳ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. اما محیط کشت عصاره کمپوست منجر به رشد سریع میسلیوم گردید. این در حالیست که در محیط کشت YPG سرعت رشد میسلیوم کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) بود. دو محیط کشت PDA و CEA در قارچ *Trametes versicolor* منجر به رشد ۳ الی ۴ میلیمتر در روز میسلیوم (سریع) شدند. در این قارچ محیط کشت MGA بهترین محیط کشت از نظر سرعت رشد شعاعی میسلیوم شده و در کلاس رشدی خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفت.

در قارچ *Pestalotiopsis versicolor* به غیر از محیط کشت YPG که در کلاس رشدی متوسط قرار گرفت، سه محیط کشت دیگر منجر به رشد ۳ الی ۴ میلیمتر در روز میسلیوم شده و در کلاس رشدی سریع قرار گرفتند. در قارچ *Trametes gibbosa* سرعت رشد محیط کشت MGA نسبت به سه محیط کشت دیگر در کلاس رشدی خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفت. در دو محیط کشت PDA و CEA سرعت رشد میسلیوم ۳ الی ۴ میلیمتر در روز ثبت شد. اما در محیط کشت YPG سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت. در قارچ *Trametes gibbosa* دو محیط کشت MGA و PDA منجر به رشد بیشتر از ۴ میلیمتر در روز میسلیوم شدند و در کلاس رشدی خیلی سریع قرار گرفتند. در محیط کشت عصاره کمپوست میسلیوم ۳ الی ۴ میلیمتر در روز رشد داشت. اما در محیط کشت YPG سرعت رشد میسلیوم ۱ الی ۲ میلیمتر در روز ثبت گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

سرعت رشد میسلیوم در قارچ *Hydnopolyporus fimbriatus* در تمامی محیط کشت‌ها بالا بود. میسلیوم در هر سه محیط کشت PDA، CEA و MGA روزانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز رشد داشت. در محیط کشت YPG سرعت رشد در کلاس رشدی سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفت. دو محیط کشت PDA و MGA در قارچ *Psathyrella candolleana* در کلاس رشدی متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. اما میسلیوم قارچ در محیط کشت YPG روزانه ۱ الی ۲ میلیمتر رشد داشت و در کلاس رشدی کند قرار گرفت. در این قارچ محیط کشت عصاره کمپوست نسبت به سه محیط کشت دیگر بهترین بوده و منجر به رشد ۳ الی ۴ میلیمتر در روز گردید. در قارچ *Pestalotiopsis versicolor* محیط کشت PDA نسبت به سه محیط کشت دیگر بهترین بوده و منجر به رشد بیشتر از ۴ میلیمتر در روز میسلیوم گردید. دو محیط کشت عصاره کمپوست و MGA نیز سرعت رشد قابل قبولی را نشان دادند و هر دو سبب رشد ۳ الی ۴ میلیمتر در روز میسلیوم قارچ شدند. اما در مقابل سرعت رشد میسلیوم در محیط کشت YPG روزانه ۱ الی ۲ میلیمتر در روز ثبت شد.

قارچ *Xylariaceae sp.* در تمامی محیط کشت‌ها سرعت رشد شعاعی کمی داشت؛ در سه محیط کشت PDA، CEA و MGA سرعت رشد در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت. در محیط کشت YPG سرعت رشد روزانه کمتر از ۱ میلیمتر در روز ثبت شد. در قارچ *Hypholoma sp.* سرعت رشد در تمامی محیط کشت‌ها کم بود، دو محیط کشت PDA و MGA در کلاس رشدی خیلی کند قرار گرفتند. میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست روزانه کمتر از ۱ میلیمتر رشد داشت. این در حالی است که در محیط کشت YPG، این قارچ هیچگونه رشدی نداشت. در محیط کشت‌های PDA و MGA قارچ *Neopestalotiopsis sp.* روزانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز رشد داشته و در کلاس رشدی خیلی سریع قرار

Archive of SID

www.SID.ir

گرفتند. محیط کشت عصاره کمپوست منجر به رشد متوسط میسلیوم قارچ گردید. محیط کشت YPG در کلاس رشدی کند (روزانه ۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت.

ب) شاخص‌های رشد کیفی میسلیوم

با توجه به جدول ۴-۱۴ مشخص گردید که محیط کشت PDA با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم بالای میسلیوم، سرعت رشد متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز)، رنگ سفید و شکل رشدی منظم بهترین محیط کشت برای قارچ *Paraconiothyrium brasiliense* می‌باشد. در محیط کشت عصاره کمپوست تراکم میسلیوم کم، سفید رنگ و شکل رشدی نامنظم می‌باشد، اما در مقابل سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی سریع قرار می‌گیرد. بافت میسلیوم در محیط کشت YPG پنبه‌ای چرمی بوده و تراکم آن زیاد و دارای رنگ سفید کرمی می‌باشد. در محیط کشت MGA میسلیوم دارای بافت پنبه‌ای، تراکم کم، رنگ سفید کرمی و سرعت رشدی متوسط بود.

بافت میسلیوم قارچ *Coprinellus disseminatus* در سه محیط کشت PDA، MGA، YPG به صورت پنبه‌ای و در محیط کشت CEA به صورت رشته‌ای بود. تراکم میسلیوم نیز در تمامی محیط کشت‌ها به غیر از محیط کشت عصاره کمپوست، زیاد بود. رنگ میسلیوم نیز در محیط کشت‌های مختلف، متفاوت بود، به این صورت که میسلیوم در دو محیط کشت MGA و YPG سفید کرمی، در محیط کشت عصاره کمپوست، سفید و در محیط کشت PDA سفید کرمی تیره بود. میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها به صورت منظم رشد کرد.

در *Trametes versicolor* رنگ میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها سفید و روند رشدی آن منظم بود. میسلیوم در سه محیط کشت PDA، MGA و YPG با بافت پنبه‌ای و تراکم زیاد و در محیط کشت CEA با

Archive of SID

www.SID.ir

بافت رشته‌ای و تراکم کم بود. سرعت رشد میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA، سریع و در محیط کشت عصاره کمپوست خیلی سریع بود.

دو محیط کشت PDA و MGA با بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم بالا، رنگ سفید، سرعت رشد سریع و روند رشدی منظم، بهترین محیط کشت در قارچ *Pestalotiopsis versicolor* می باشند. در قارچ *Trametes gibbosa* در محیط کشت MGA، میسلیوم دارای بافت پنبه‌ای بوده و همچنین تراکم آن در این محیط کشت بالا بود. علاوه براین رنگ سفید میسلیوم، روند رشدی منظم و از همه مهمتر سرعت رشد خیلی سریع در این محیط ثبت شده است. محیط کشت عصاره کمپوست منجر به رشد میسلیوم با بافت رشته‌ای شد؛ اما تراکم میسلیوم در این محیط کشت کم بود، در مقابل سرعت رشد میسلیوم روزانه ۳ الی ۴ میلیمتر در روز بود. بافت میسلیوم در دو محیط کشت دیگر به صورت پنبه‌ای بود. اما در محیط کشت YPG سرعت رشد در کلاس رشدی کند قرار گرفت.

دو محیط کشت PDA و MGA با بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) شاخص‌های رشدی کیفی مشابهی در میسلیوم قارچ *Trametes gibbosa* داشتند. در محیط کشت عصاره کمپوست سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی سریع قرار گرفت، بافت میسلیوم به صورت رشته‌ای کرکی و تراکم میسلیوم کم بود. در تمامی محیط کشت‌ها روند رشدی میسلیوم منظم و رنگ آن سفید بود. در قارچ *Hydnopolyporus fimbriatus* بافت میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA پنبه‌ای، تراکم میسلیوم زیاد، رنگ میسلیوم سفید و روند رشدی آن، منظم بود. علاوه بر این سرعت رشد در هر دو محیط کشت بیشتر از ۴ میلیمتر در روز بود (خیلی سریع). در محیط کشت عصاره کمپوست سرعت رشد خیلی

Archive of SID

www.SID.ir

سریع بود، بافت میسلیوم به صورت رشته‌ای و تراکم میسلیوم خیلی کم بود. در قارچ *Psathyrella candolleana* دو محیط کشت PDA و MGA گزینه‌ی مناسبی به منظور رشد میسلیوم قارچ می‌باشد. در این دو محیط کشت، بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای، تراکم میسلیوم زیاد و سرعت رشد آن ۲ الی ۳ میلیمتر در روز (متوسط) بود. در محیط کشت عصاره کمپوست سرعت رشد سریع، اما بافت میسلیوم کرکی و تراکم میسلیوم کم بود. همچنین روند رشدی میسلیوم نامنظم بود.

در قارچ *Pestalotiopsis versicolor* محیط کشت PDA با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) بهترین محیط کشت برای رشد میسلیوم این قارچ می‌باشد. ویژگی‌های رشدی میسلیوم در محیط کشت MGA همانند محیط کشت PDA بوده، با این تفاوت که در محیط کشت MGA سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی سریع قرار گرفت. تراکم میسلیوم در محیط کشت CEA کم، روند رشدی به صورت نامنظم و بافت میسلیوم کرکی پنبه‌ای ثبت شد. در تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمایش بافت میسلیوم قارچ *Xylariaceae sp.* به صورت کرکی سطحی و صورتی رنگ بود. اما تراکم در دو محیط کشت PDA و MGA زیاد و در محیط کشت YPG و عصاره کمپوست، کم و خیلی خیلی کم بود. سرعت رشد در سه محیط کشت PDA، MGA و عصاره کمپوست کند و در محیط کشت YPG، خیلی کند بود. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده می‌توان گفت دو محیط کشت PDA و MGA در بین محیط کشت‌های مورد استفاده در **آزمایش، گزینه** مناسبی جهت رشد میسلیوم قارچ *Xylariaceae sp.* می‌باشند. در قارچ *Hypholoma sp.* سرعت رشد میسلیوم در تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمایش در کلاس رشدی کند و خیلی کند قرار گرفت. در محیط کشت PDA بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود. در دو محیط کشت CEA و YPG بافت میسلیوم به صورت کرکی و تراکم میسلیوم کم بود.

Archive of SID

www.SID.ir

در قارچ Neka 29-1 دو محیط کشت PDA و MGA با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع بهترین گزینه در رشد میسلیوم می‌باشند.

۴-۴-۳-۲- تولید اسپاون (سری ج)

با توجه به وضعیت رشد رویشی میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون مشخص گردید که اسپان دانه‌های گندم در قارچ‌های *Hydnopolyporus fimbriatus*، *Pestalotiopsis versicolor* و *Xylariaceae sp* رشدی نداشت. اما اسپاون دانه‌های گندم در قارچ‌های *Trametes gibbosa*، *Coprinellus disseminatus* و *Psathyrella candolleana*، *Trametes versicolor*، *Pestalotiopsis versicolor*، *Paraconiothyrium brasiliense* و *Trametes gibbosa*، *Neopestalotiopsis sp.* و *Hypholoma sp.* رشد مناسبی را نشان داد (شکل ۴-۱۶).

۴-۴-۳-۳- کشت معلق **میسلیوم(سری ج)**

کشت‌های تعلیقی جدایه‌های سری ج در حجم ۴۰ میلی‌لیتر در انکوباتور شیکردار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از خروج ویال‌ها از انکوباتور، مشاهدات نشان داد کندترین رشد میسلیومی (از نظر پر کردن محیط مایع) مربوط به گونه‌ی *Neopestalotiopsis sp* و سریعترین مربوط به گونه‌های *Hypholoma sp*، *Paraconiothyrium brasiliense*، *Xylariaceae sp*، *Hydnopolyporus fimbriatus*، *Trametes gibbosa*، *Coprinellus disseminatus*، *Pestalotiopsis versicolor*، *Trametes versicolor*، *Psathyrella candolleana*، *Trametes gibbosa* و *Pestalotiopsis versicolor* بود. رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف قارچ، متفاوت بود. در برخی از آن‌ها میسلیوم به طور یکنواخت و متراکم سراسر محیط کشت مایع را پر کرد و

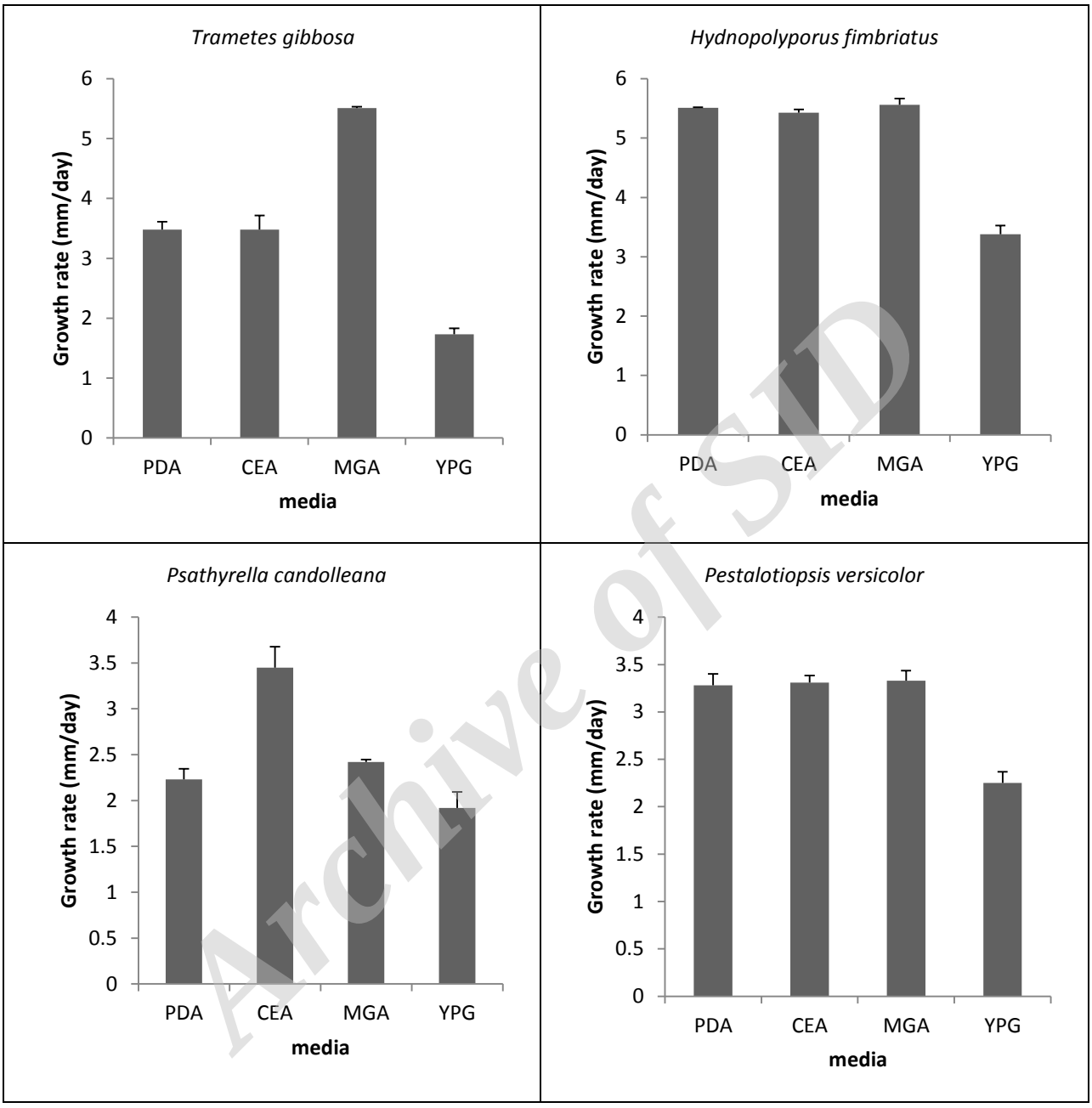
Archive of SID

www.SID.ir

در حالی که رشد میسلیوم برخی گونه‌ها به صورت پراکنده و کم تراکم بود. پس از پایان بررسی و مشاهدات، محیط مایع کشت از طریق کاغذ صافی استریل حذف و میسلیوم‌ها از روی کاغذ صافی در شرایط استریل جمع آوری و در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه‌سانتیگراد خشک شدند. در انتها وزن میسلیوم خالص محاسبه گردید و جدایه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. وزن میسلیوم خالص در حجم ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، بین ۲/۱۹ گرم تا ۱۸/۴۹ گرم متغیر بود. کمترین توده میسلیومی مربوط به گونه *Hypholoma sp.* (۲/۱۹ گرم) و بیشترین وزن توده میسلیومی مربوط به گونه *Neopestalotiopsis sp* (۱۸/۴۹گرم) بود ($p < 0.05$) (شکل ۴-۱۳).

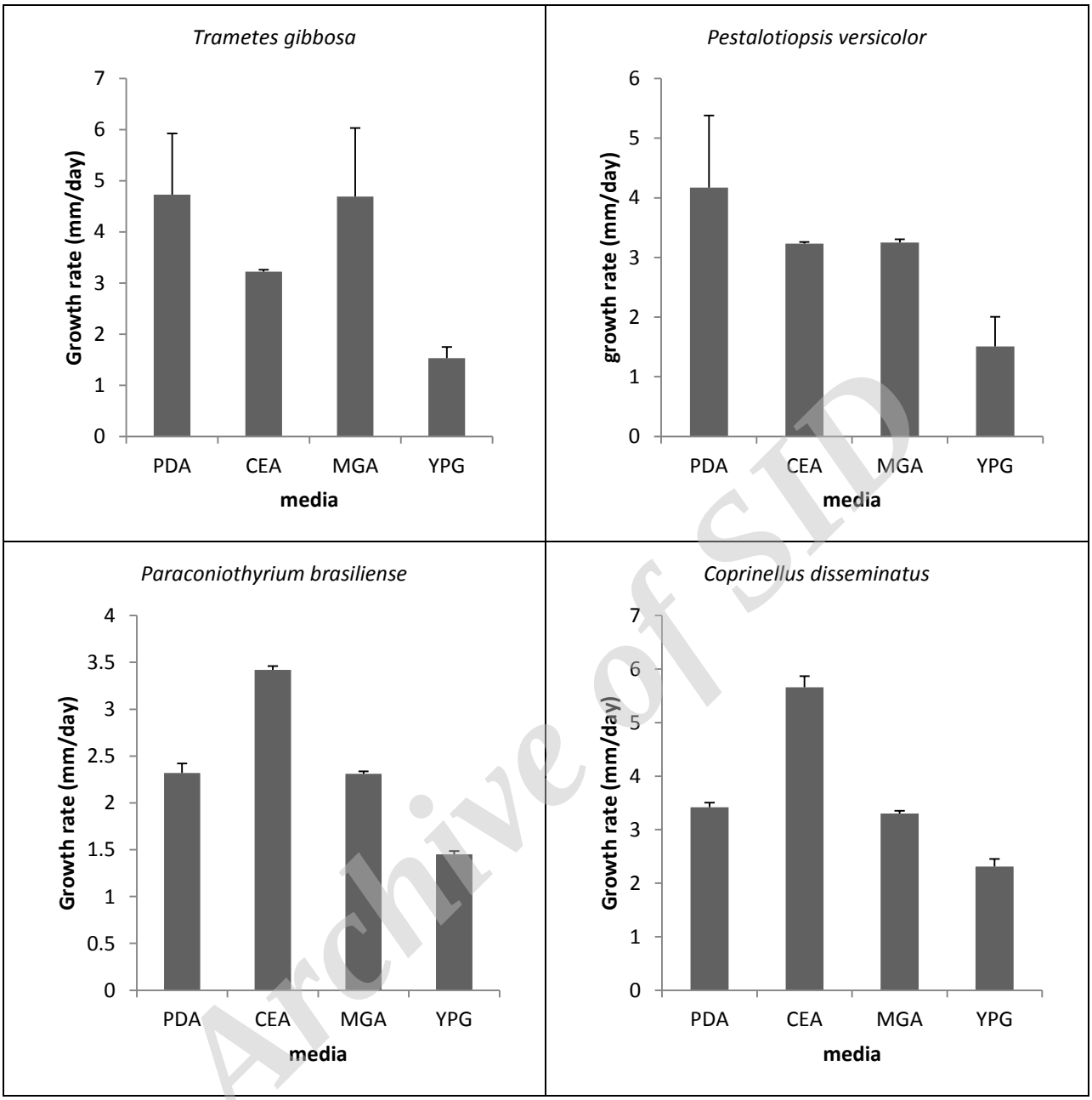
شکل ۴-۱۳- کشت معلق میسلیوم در برخی از جدایه‌های قارچ‌های بومی (سری ج)

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴-۱۴- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ج)

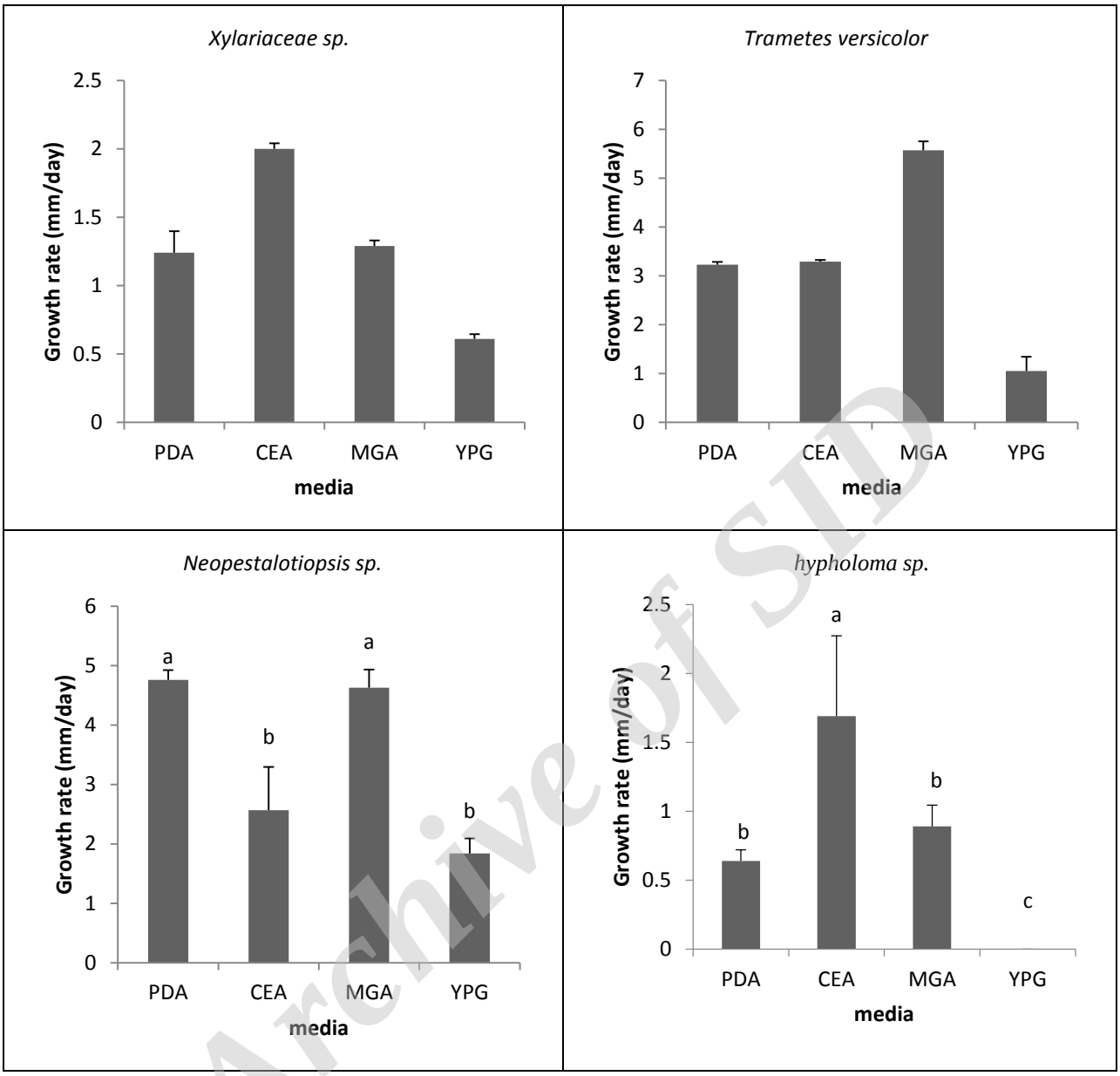
Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۴- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ج)

Archive of SID

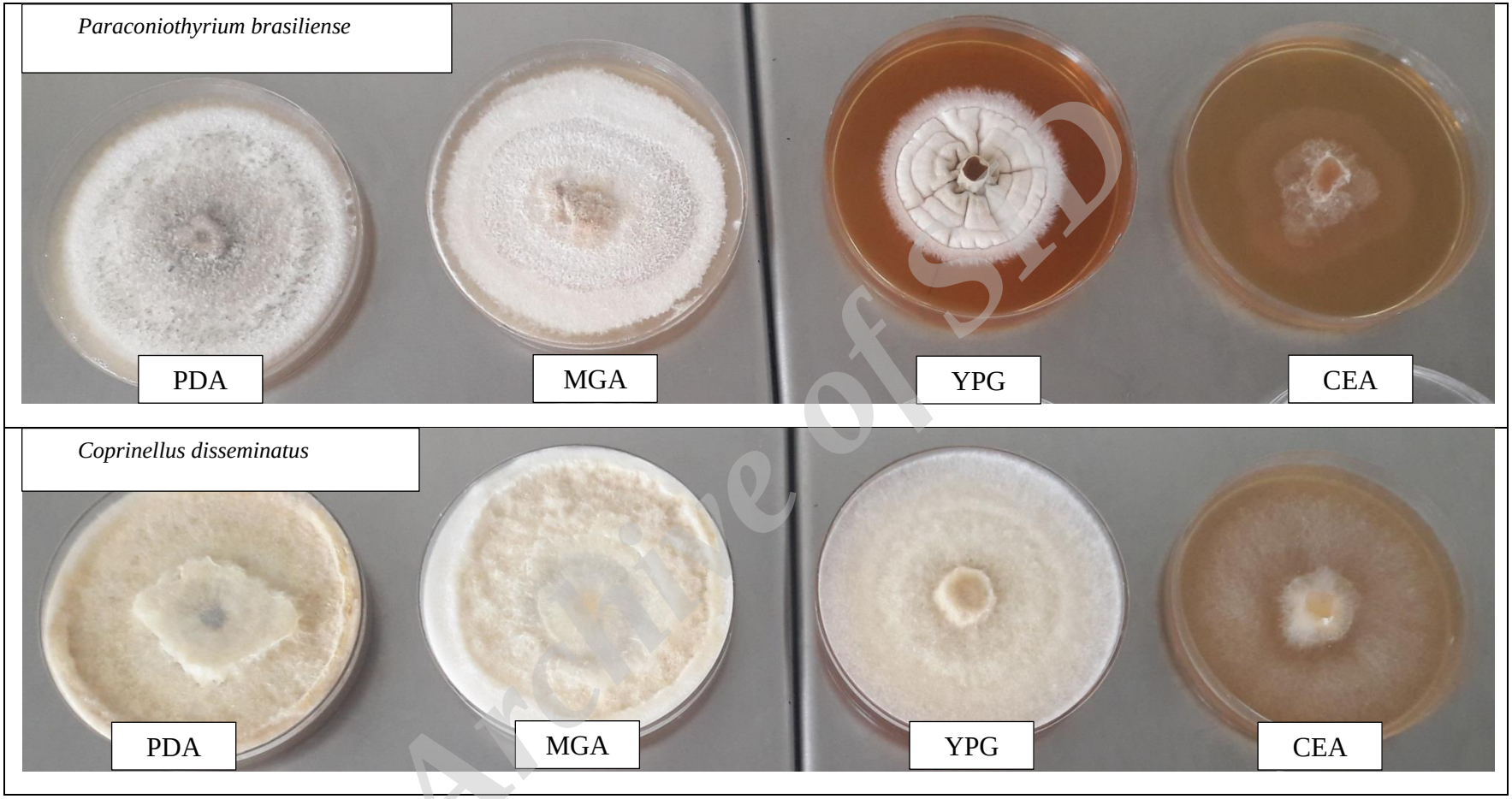
www.SID.ir



ادامه شکل۴-۱۴- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ج)

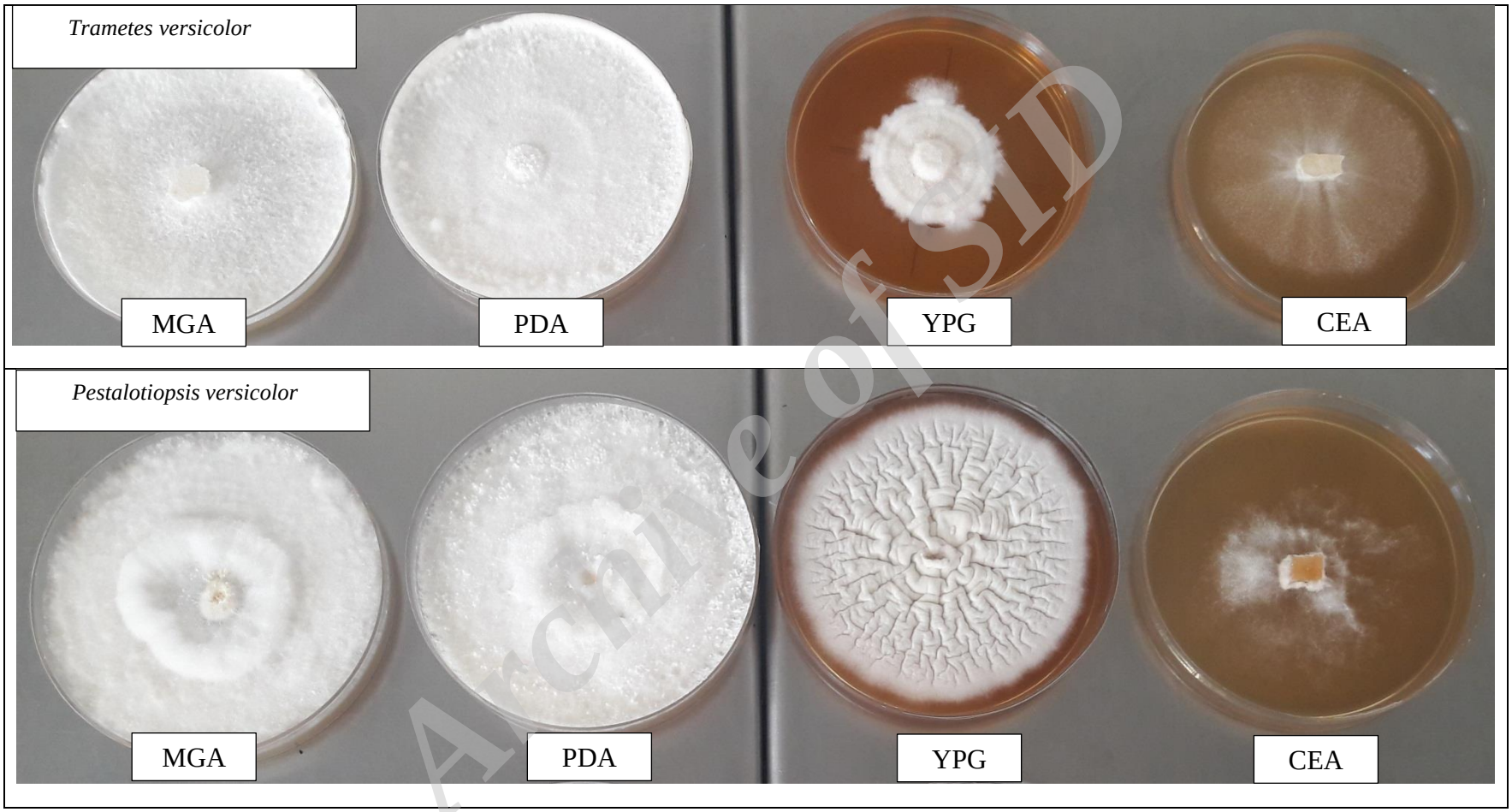
Archive of SID

www.SID.ir



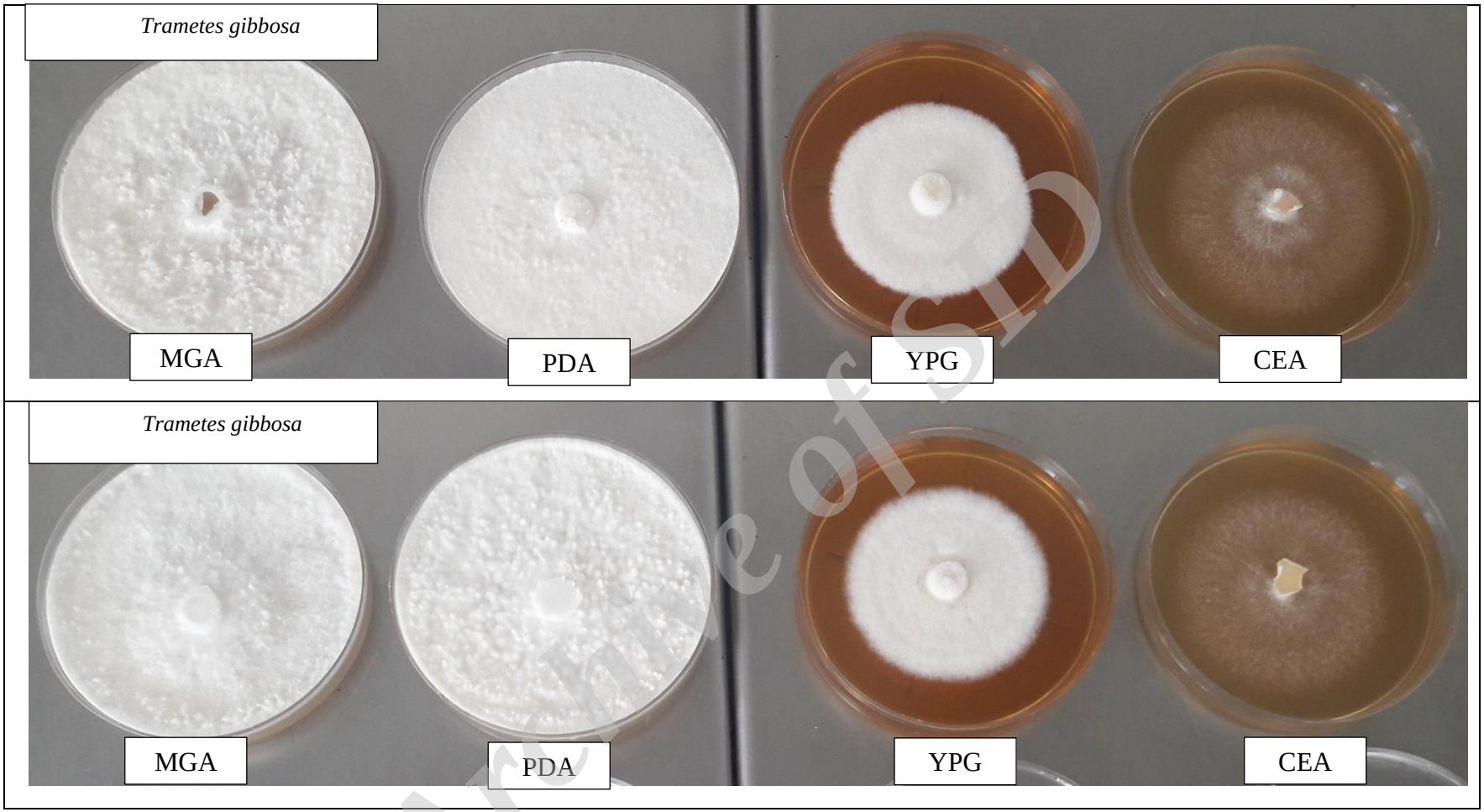
شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ج)

Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف **(سری ج)**

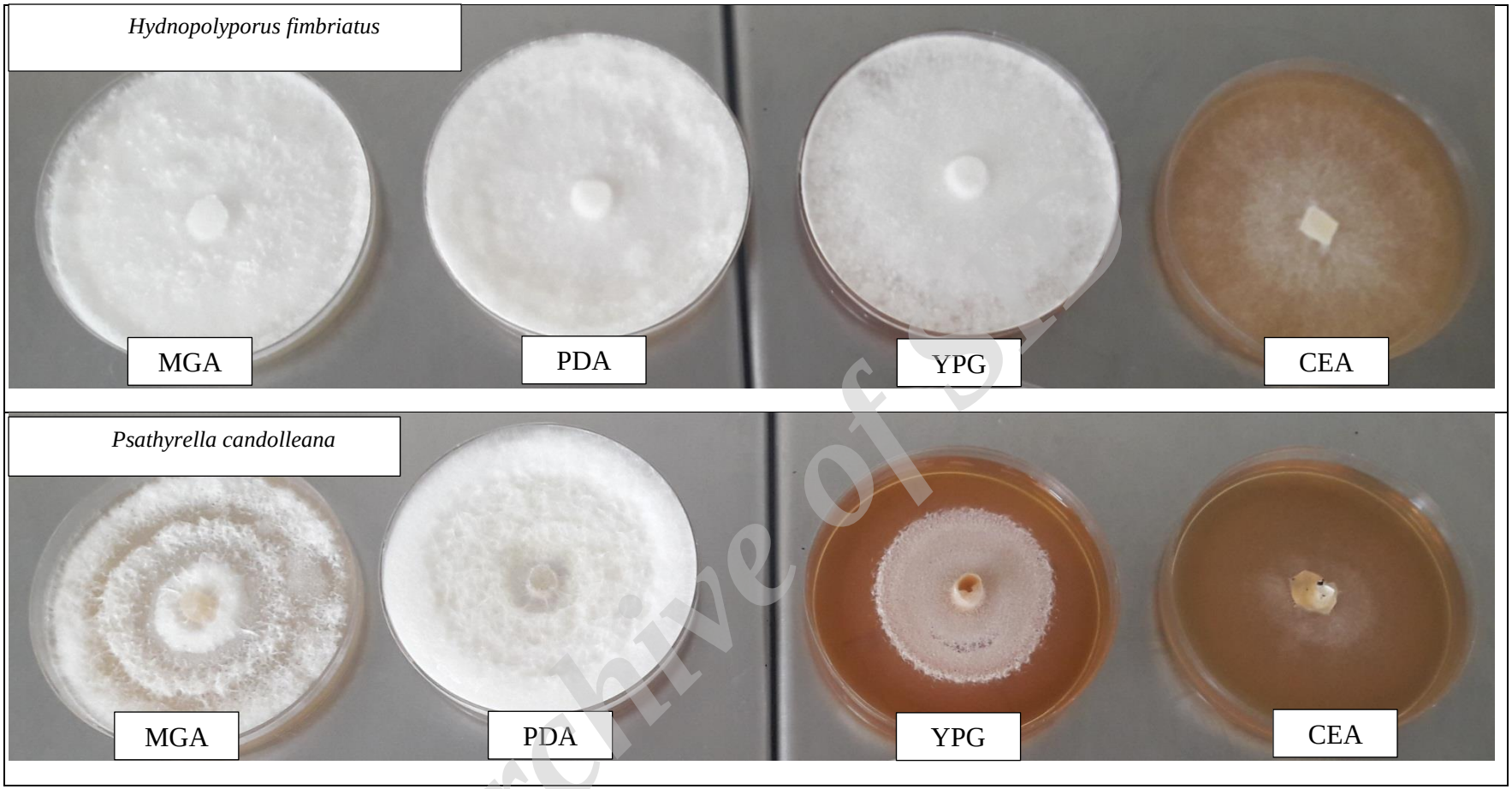
Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف **(سری ج)**

Archive of SID

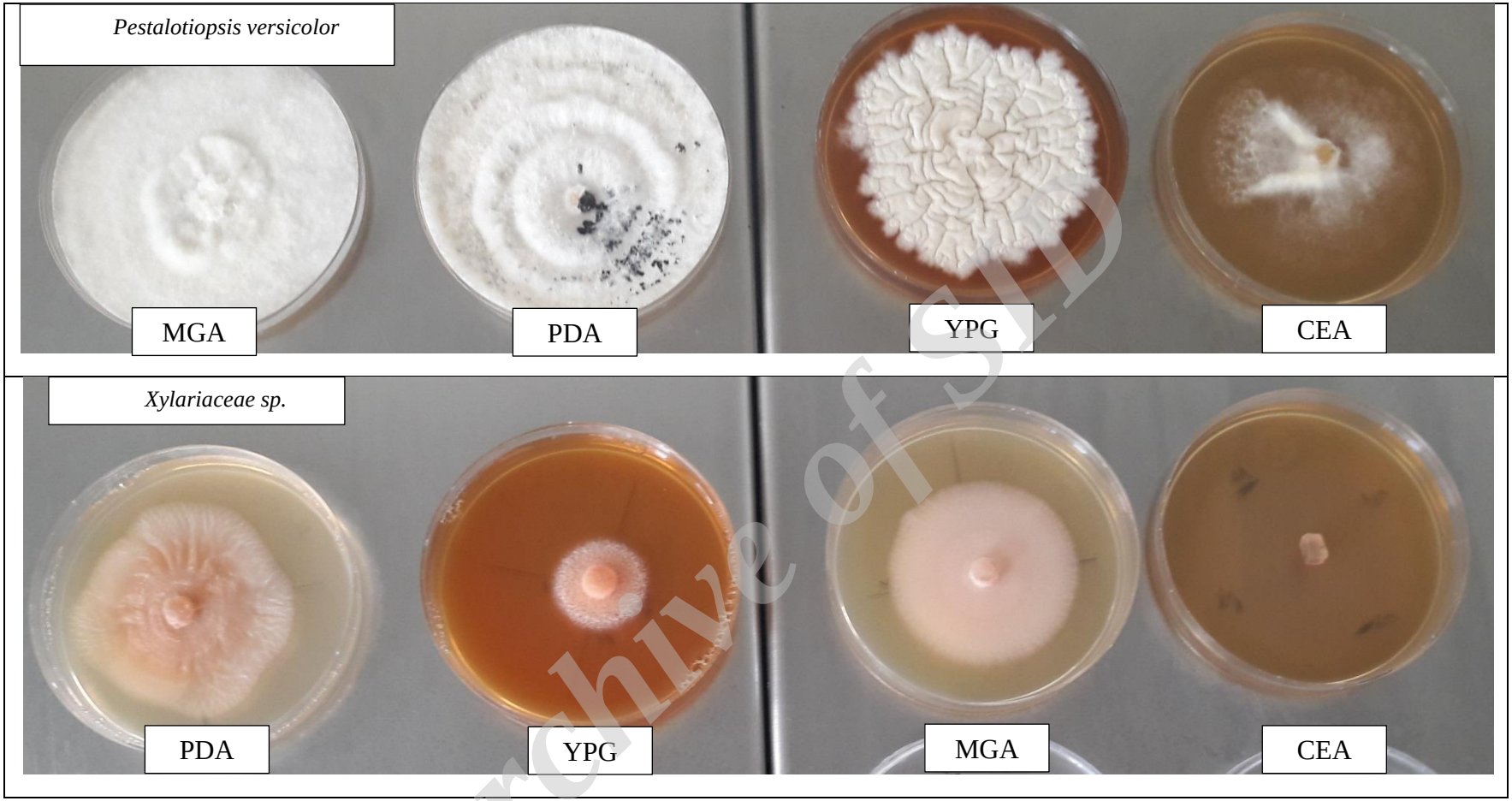
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف **(سری ج)**

Archive of SID

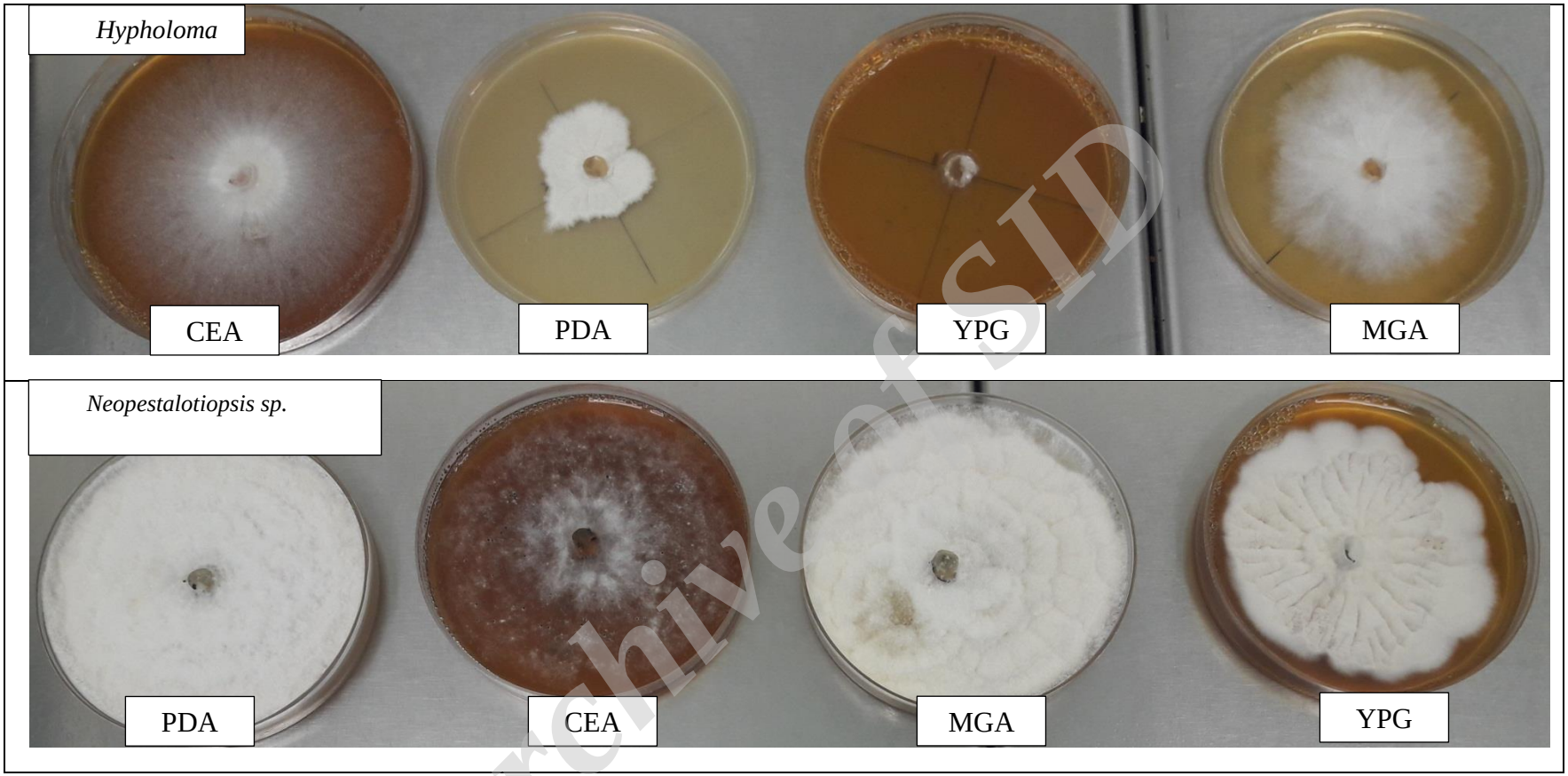
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف **(سری ج)**

Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۵- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از گونه‌های قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف **(سری ج)**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۱۲- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ج)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Paraconiothyrium brasiliense	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۳	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه ای	۳	سفید کرمی	منظم
	YPG	پنبه ای چرمی	۵	سفید کرمی	منظم
Coprinellus disseminatus	PDA	پنبه ای	۵	سفید کرمی تیره	منظم
	CEA	رشته ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید کرمی	منظم
	YPG	پنبه ای	۵	سفید کرمی	منظم
Trametes versicolor	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه ای	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۲- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت. (سری ج)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم**	رنگ	شکل هندسی رشد
Pestalotiopsis versicolor	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	پنبه ای کرکی	۳	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	چرمی	۵	سفید	منظم
Trametes gibbosa	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه ای	۵	سفید	منظم
Trametes gibbosa	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته ای کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه ای	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۲- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ج)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Hydnopolyporus fimbriatus	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته ای	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه ای	۵	سفید	منظم
Psathyrella candolleana	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۲	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه ای	۳	سفید	منظم
Pestalotiopsis versicolor	PDA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی پنبه ای	۳	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه ای	۵	سفید	منظم
	YPG	چرمی پنبه ای	۵	سفید	منظم

.**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

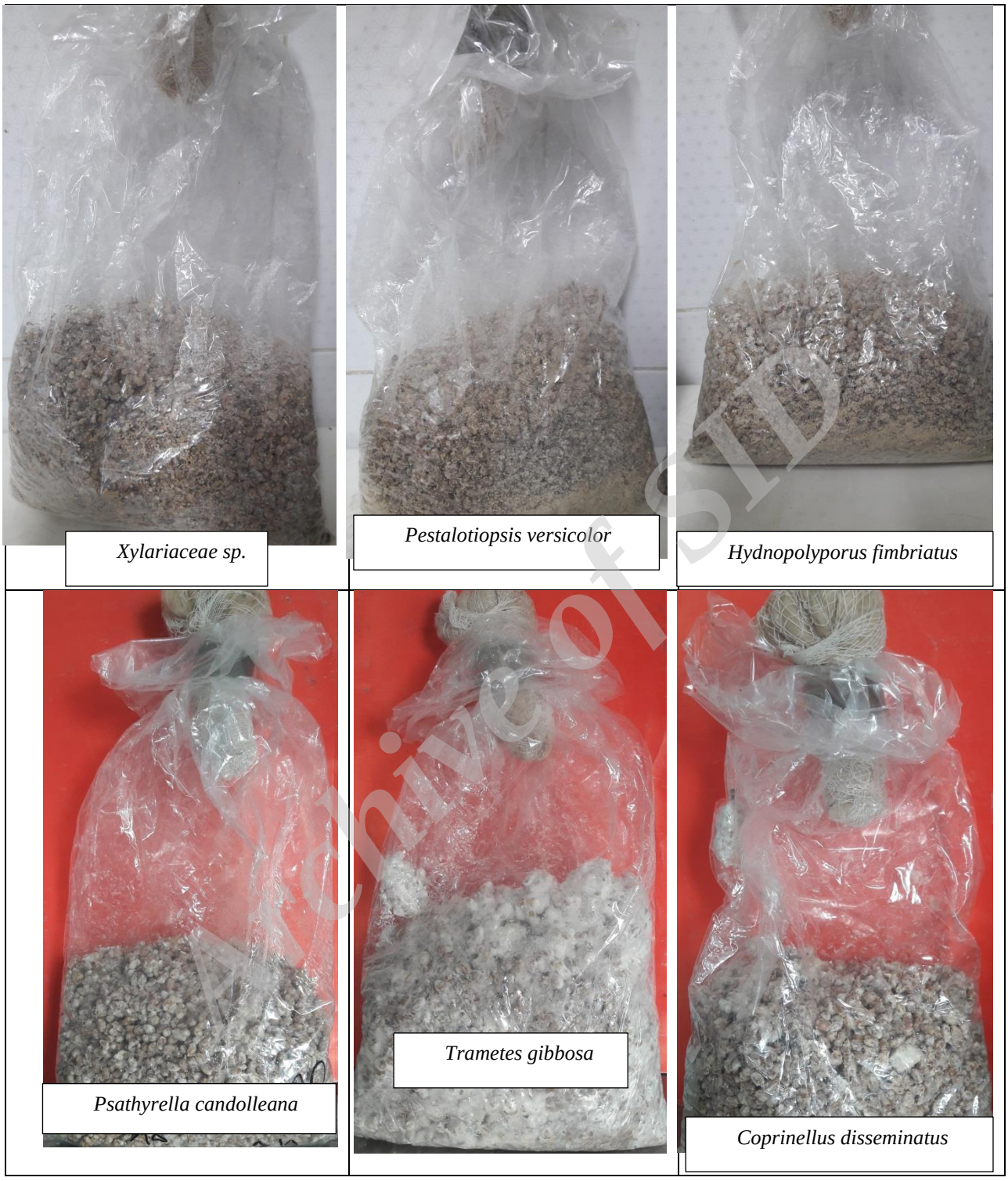
ادامه جدول ۴-۱۲- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۲ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ج)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Xylariaceae sp.	PDA	کرکی سطحی صورتی	۵	صورتی	منظم
	CEA	کرکی سطحی صورتی	۱	صورتی	منظم
	MGA	کرکی سطحی صورتی	۵	صورتی	منظم
	YPG	کرکی سطحی صورتی	۳	صورتی	منظم
Hypholoma sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	کرکی پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	YPG	کرکی	۲	سفید	منظم
Neopestalotiopsis sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای چرمی	۵	سفید	نامنظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۱۶- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ج)

Archive of SID
www.SID.ir

ادامه شکل۴-۱۶- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه‌های گندم (سری ج)

www.SID.ir

۴- ۴-۴- زراعی‌سازی سری د (۱۵ نمونه)

۴-۴-۴-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری د)

الف) سرعت رشد شعاعی میسلیوم

با توجه به نتایج آنالیز واریانس (جدول ۴-۱۳) مشخص گردید که تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت‌ها از نظر تاثیر بر سرعت رشد شعاعی میسلیوم در قارچ های D.21، (Gps 038) *Ganoderma sp.*، *Trametes hirsuta*، *Ganoderma sp. (Gps 052)*، *Stereum hirsutum*، *Xylariaceae sp.*، *Trametes gibbosa*، D.11، *Irpex lacteus*، *Ganoderma sp. (Gps 037)*، 057، 12 و 047 در سطوح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۱ درصد وجود داشت. لذا ا نمودارهای تغییرات سرعت رشد شعاعی (شکل ۴-۱۸) و همچنین جدول مقایسه میانگین برای این نمونه‌ها ترسیم شد (جدول ۴-۱۷).

جدول ۴-۱۳- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

منبع تغییرات	درجه آزادی	Darabkola 21	*Ganoderma sp.* *(Gps 038)*	*Ganoderma sp.* *(Gps 017)*	*Trametes hirsuta*	*Ganoderma sp.* *(Gps 052)*
محیط کشت	۳	۱۰/۳۲۱**	۴/۱۹۱**	۰/۱۲۶^{ns}	۷/۶۹۵**	۲/۸۹۱**
خطا	۸	۰/۱۸۳	۰/۰۲۲	۰/۲۰۷	۰/۰۲۰	۰/۳۷۶

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۳- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Stereum hirsutum*	*Ganoderma sp.* (*Bozchaft 2*)	*Xylariaceae sp*.	Darabkola 11	*Trametes gibbosa*
محیط کشت	۳	۵/۷۷۵**	۰/۴۲۶^{ns}	۰/۸۰۰**	۲۵/۰۰۸**	۷/۴۰۳**
خطا	۸	۰/۰۲۲	۰/۱۰۹	۰/۰۴۳	۱/۰۶۹	۰/۰۲۴

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۴-۱۳- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Irpex lacteus*	*Ganoderma sp.* (*Gps 037*)	Gps 057	Gps 12	Gps 047
محیط کشت	۳	۱۱/۸۲۵**	۶/۷۲۳**	۵/۵۲۰**	۶/۷۱۰*	۳/۲۱۴*
خطا	۸	۰/۷۶۹	۰/۰۱۱	۰/۰۵۰	۱/۳۰۹	۰/۵۶۳

**، * و ^{ns} به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به شکل ۴-۱۸ مشخص گردید که در قارچ *Irpex lacteus* تمامی محیط‌کشت‌های مورد استفاده در آزمایش منجر به رشد بیشتر از ۴ میلیمتر در روز میسلیوم شده و در کلاس رشدی خیلی سریع قرار گرفتند. در قارچ gps12 میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها (PDA، MGA و CEA)، بجز محیط کشت YPG سرعت رشد شعاعی بیشتر از ۴ میلیمتر در روز (خیلی سریع) داشت. سرعت رشد شعاعی میسلیوم در قارچ *Ganoderma sp. (Gps 017)* در هر چهار محیط کشت مورد استفاده در آزمایش، کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) بود.

سرعت رشد شعاعی میسلیوم در سه محیط کشت PDA، CEA و MGA روزانه ۲ الی ۳ میلیمتر در روز (متوسط) بود. این در حالی است که در محیط کشت YPG سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی خیلی کند (کمتر از ۱ میلیمتر در روز) قرارگرفت. در قارچ *Ganoderma sp. (Gps 037)* سرعت رشد میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) ثبت شد. سرعت رشد میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست، ۳ الی ۴ میلیمتر در روز و در محیط کشت YPG ۱ الی ۲ میلیمتر در روز بود. با توجه به نتایج مشخص می‌شود که دو محیط کشت PDA و MGA بهترین محیط کشت می‌باشند. نتایج بدست آمده از سرعت رشد شعاعی میسلیوم در قارچ *Ganoderma sp. (Gps 038)* نیز همانند قارچ *Ganoderma sp. (Gps 037)* بود.

در دو قارچ *Trametes gibbosa* و *Trametes hirsuta* سرعت رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت YPG، ۱ الی ۲ میلیمتر در روز (کند) و در سه محیط کشت دیگر مورد استفاده در آزمایش بیشتر از ۴ میلیمتر در روز (خیلی سریع) بود. محیط کشت MGA در قارچ gps047 منجر به سرعت رشد شعاعی خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) میسلیوم گردید. میسلیوم این قارچ در دو محیط کشت عصاره کمپوست و PDA

Archive of SID

www.SID.ir

سرعت رشد متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) داشت. همچنین میسلیوم قارچ در محیط کشت YPG ۱ الی ۲ میلیمتر در روز رشد داشت. در قارچ(Gps 052) *Ganoderma sp.* دو محیط کشت PDA و MGA بهترین محیط کشت بوده و منجر به رشد خیلی سریع میسلیوم (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) شدند. میسلیوم قارچ *Ganoderma sp.* (GPS052) در محیط کشت عصاره کمپوست رشد سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) داشت.

محیط کشت MGA در مقایسه با سایر محیط کشت‌ها در قارچ GPS057، بهترین بود، چرا که میسلیوم روزانه ۳ الی ۴ میلیمتر رشد داشت و در کلاس رشدی سریع قرار گرفت. سرعت رشد میسلیوم در محیط کشت PDA، CED و YPG، به ترتیب متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز)، کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) و خیلی کند (کمتر از ۱ میلیمتر در روز) بود. سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ *Ganoderma sp.* (BOZCHAFT 2) در تمامی محیط کشت‌ها، روزانه ۱ الی ۲ میلیمتر در روز (کند) بود.

در قارچ *Stereum hirsutum* بهترین محیط‌کشت از لحاظ سرعت رشد شعاعی میسلیوم، PDA و MGA بودند؛ چرا که در کلاس رشدی خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. دو محیط کشت دیگر (CEA، YPG) در کلاس رشدی متوسط (۲ الی ۳ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ DARABKOLA 11 در سه محیط کشت PDA، MGA و CEA روزانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز (خیلی سریع) ثبت شد. در مقابل سرعت رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت YPG روزانه ۲ الی ۳ میلیمتر در روز (متوسط) بود. محیط کشت MGA در قارچ DARABKOLA 21 بهترین محیط کشت بود؛ چرا که میسلیوم روزانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز رشد داشت. سرعت رشد میسلیوم در دو محیط کشت PDA و CEA روزنه ۲ الی ۳ میلیمتر د روز بود.

Archive of SID

www.SID.ir

ب)شاخص‌های رشدی کیفی میسلیوم

مجموع شاخص‌های رشدی میسلیوم گونه‌های قارچ‌های بومی از جمله نوع بافت، تراکم، رنگ و شکل ظاهری رشد میسلیوم در جدول ۴-۱۴ ارائه شده است. با توجه به نتایج مندرج در جدول مشخص گردید که رنگ میسلیوم در تمامی قارچ‌های مورد بررسی در این سری، سفید رنگ بود.

بافت میسلیوم در هر سه محیط کشت PDA، MGA و YPG، پنبه‌ای بود. تراکم میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA زیاد و در محیط کشت عصاره کمپوست و YPG به ترتیب کم و متوسط بود. در محیط کشت عصاره کمپوست بافت میسلیوم به صورت کرکی بود. با توجه به شاخص‌های کیفی و سرعت رشد میسلیوم می‌توان بیان کرد که بهترین محیط کشت جهت رشد میسلیوم در قارچ *Irpex lacteus*، دو محیط کشت PDA و MGA می‌باشد. با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع در محیط کشت MGA، بهترین محیط کشت برای قارچ GPS12، محیط کشت MGA می‌باشد. در دو محیط کشت PDA و YPG، بافت میسلیوم، پنبه‌ای بود، اما تراکم میسلیوم در محیط کشت PDA، متوسط و سرعت رشد در محیط کشت YPG، متوسط بود. بافت کرکی میسلیوم و تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست از اهمیت این محیط کشت جهت رشد میسیلوم تین قارچ، کاست. همانطور که قبلا ذکر گردید سرعت رشد قارچ (GPS017) *Ganoderma sp.* در تمامی محیط کشت‌ها کند بود، در محیط کشت YPG، بافت میسلیوم پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد و شکل رشدی میسلیوم منظم بود. در دو محیط کشت PDA و MGA بافت رشته‌ای پنبه‌ای و تراکم متوسط داشت. محیط کشت عصاره کمپوست برای رشد این قارچ مناسب نبود.

Archive of SID

www.SID.ir

قارچ *Xylariaceae sp.* در محیط کشت PDA بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود. البته باید توجه داشت که میسیلوم در این محیط کشت روند رشدی نامنظمی داشت. بافت میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست، MGA و YPG به ترتیب رشته‌ای، رشته‌ای پنبه‌ای و چرمی بود. میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست تراکم کمی داشت و در دو محیط کشت MGA و YPG متوسط بود. در دو قارچ *Ganoderma sp.*و(*Ganoderma sp.(GPS038* بهترین محیط کشت‌ها با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع، PDA و MGA بود. محیط کشت عصاره کمپوست، گزینه مناسبی جهت رشد میسلیوم این دو قارچ با توجه به شاخص‌های کیفی رشد نمی‌باشد.

در قارچ *Trametes hirsuta*، بهترین محیط کشت‌ها، PDA و MGA می‌باشند. در هر دو محیط کشت بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای، تراکم میسلیوم زیاد و سرعت رشد خیلی سریع بود. اگرچه که سرعت رشد میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست خیلی سریع بود، اما تراکم آن، خیلی خیلی کم بود. در محیط کشت YPG بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم زیاد بود، اما سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت. بهترین محیط کشت با توجه به شاخص‌های کیفی رشد میسلیوم و سرعت رشد میسلیوم در قارچ GPS047، محیط کشت MGA می‌باشد. در این محیط کشت، بافت میسلیوم پنبه‌ای، تراکم آن زیاد و سرعت رشد خیلی سریع بود. با فت میسلیوم در محیط کشت YPG پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود، اما سرعت رشد میسلیوم کند بود. محیط کشت عصاره کمپوست نیز محیط کشت مناسبی برای رشد میسلیوم این قارچ نمی‌باشد.

در قارچ *Ganoderma sp.* میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA، بافت پنبه‌ای ، تراکم زیاد و سرعت رشد خیلی سریعی داشت. بافت میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست به صورت رشته‌ای بود، اما

Archive of SID

www.SID.ir

تراکم میسلیوم در این محیط کشت خیلی کم بود، با این حال سرعت رشد میسلیوم سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) بود. میسلیوم قارچ GPS057 در محیط کشت MGA، PDA و YPG، بافت پنبه‌ای داشت. تراکم میسلیوم در دو محیط کشت MGA و YPG، متوسط و در محیط کشت PDA زیاد بود؛ اما محیط کشت عصاره کمپوست تراکم میسلیوم خیلی خیلی کمی داشت. با توجه به شاخص‌های کیفی رشد مشخص گردید که دو محیط کشت PDA و MGA، محیط کشت‌های مناسبی جهت رشد میسلیوم این قارچ می‌باشند.

در دو محیط کشت PDA و MGA میسلیوم قارچ *Trametes gibbosa*، بافت پنبه‌ای، تراکم زیاد و سرعت رشد خیلی سریع داشت. در نتیجه بهترین محیط کشت جهت رشد میسلیوم این قارچ می‌باشند. سرعت رشد در محیط کشت YPG، کند و تراکم میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست خیلی خیلی کم بود. همانطور که قبلا ذکر گردید سرعت رشد در تمامی محیط‌کشت‌ها در قارچ *Ganoderma sp.* (BOZCHAFT 2) کند بود. اما بافت میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها به غیر از عصاره کمپوست، پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود.

در سه قارچ، *Stereum hirsutum*، DARABKOLA 11 و DARABKOLA 21 بافت میسلیوم به صورت کرکی و تراکم آن خیلی خیلی کم بود، اما سرعت رشد میسلیوم این قارچ‌ها در محیط کشت عصاره کمپوست به ترتیب متوسط (۲الی ۳ میلیمتر در روز)، خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) و سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) بود. در قارچ *Stereum hirsutum*، بهترین محیط کشت‌ها با توجه به بافت پنبه‌ای میسلیوم، تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد خیلی سریع، PDA و MGA بود. محیط کشت PDA، در قارچ DARABKOLA 11، با توجه به شاخص‌های کیفی میسلیوم (بافت پنبه‌ای، تراکم زیاد میسلیوم) بهترین محیط کشت بود. در این قارچ بافت میسلیوم در محیط کشت MGA، کرکی پنبه‌ای، تراک میسلیوم زیاد و سرعت رشد میسلیوم خیلی سریع بود. در قارچ DARABKOLA 21، محیط کشت MGA، بترین محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت بود، بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای، تراکم میسلیوم زیاد و سرعت رشد در کلاس رشدی خیلی سریع بود. همچنین محیط کشت PDA با بافت پنبه‌ای میسلیوم و تراکم زیاد میسلیوم و سرعت رشد سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز)، نیز محیط کشت مناسبی جهت رشد میسلیوم این قارچ می‌باشد.

۴-۴-۴-۲- تولید اسپاون (سری د)

با توجه به وضعیت رشد رویشی میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون مشخص گردید که اسپان دانه‌های گندم در قارچ‌های *Ganoderma sp.* (*gps 038*)، *Ganoderma sp.* (*gps017*)، *Ganoderma* (*gps052*)، *Stereum hirsutum*، *sp.* رشدی نداشت. اما اسپاون دانه‌های گندم در قارچ‌های *Darabkola*، *Darabkola11*، *Ganoderma sp.* (*gps037*)، *Irpex lacteus* و *Xylariaceae sp.* رشد مناسبی را نشان داد (شکل ۴-۲۰).

۴-۴-۴-۳- کشت معلق میسلیوم (سری د)

کشت‌های تعلیقی جدایه‌های سری د در حجم ۴۰ میلی‌لیتر در انکوباتور شیکردار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از خروج ویال‌ها از انکوباتور، مشاهدات نشان داد کندترین رشد میسلیومی (از نظر پر کردن محیط مایع) مربوط به گونه‌ی *Ganoderma sp.* (*Gps 017*) و سریعترین مربوط به گونه‌های *Xylariaceae sp*، *Irpex lacteus*، *Trametes hirsuta*، *Trametes gibbosa*، *Stereum hirsutum*، *Gps12*، *Ganoderma sp.*، *gps047*، *Ganoderma sp.*، *Gps057*، *Ganoderma sp.*، *Darabkola 11*، *Darabkola 21*، *Ganoderma*

Archive of SID

www.SID.ir

sp. بود. رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف قارچ، متفاوت بود. در برخی از آن‌ها میسلیوم به طور یکنواخت و متراکم سراسر محیط کشت مایع را پر کرد و در حالی که رشد میسلیوم برخی گونه‌ها به صورت پراکنده و کم تراکم بود. پس از پایان بررسی و مشاهدات، محیط مایع کشت از طریق کاغذ صافی استریل حذف و میسلیوم‌ها از روی کاغذ صافی در شرایط استریل جمع آوری و در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه-سانتیگراد خشک شدند. در انتها وزن میسلیوم خالص محاسبه گردید و جدایه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. وزن میسلیوم خالص در حجم ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، ۲/۲۳ گرم تا ۱۳/۹۴ گرم متغیر بود. کمترین توده میسلیومی مربوط به گونه *Stereum hirsutum* (۲/۲۳ گرم) و بیشترین وزن توده میسلیومی مربوط به گونه *Irpex lacteus* (۱۳/۹۴ گرم) بود. ($p < 0.05$) (شکل ۴-۱۷).

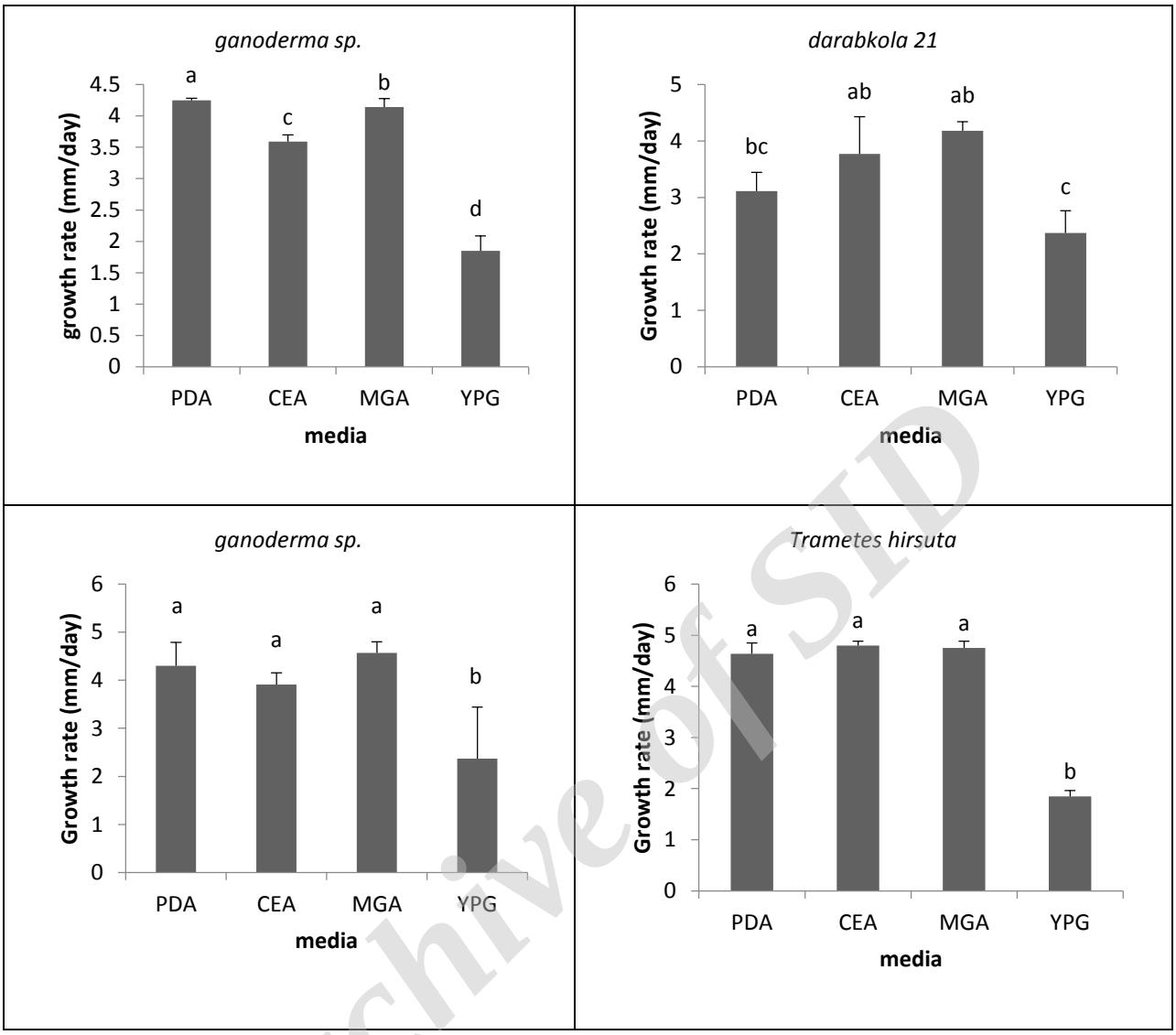
Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۱۷- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه‌های قارچ بومی (سری د)

Archive of SID

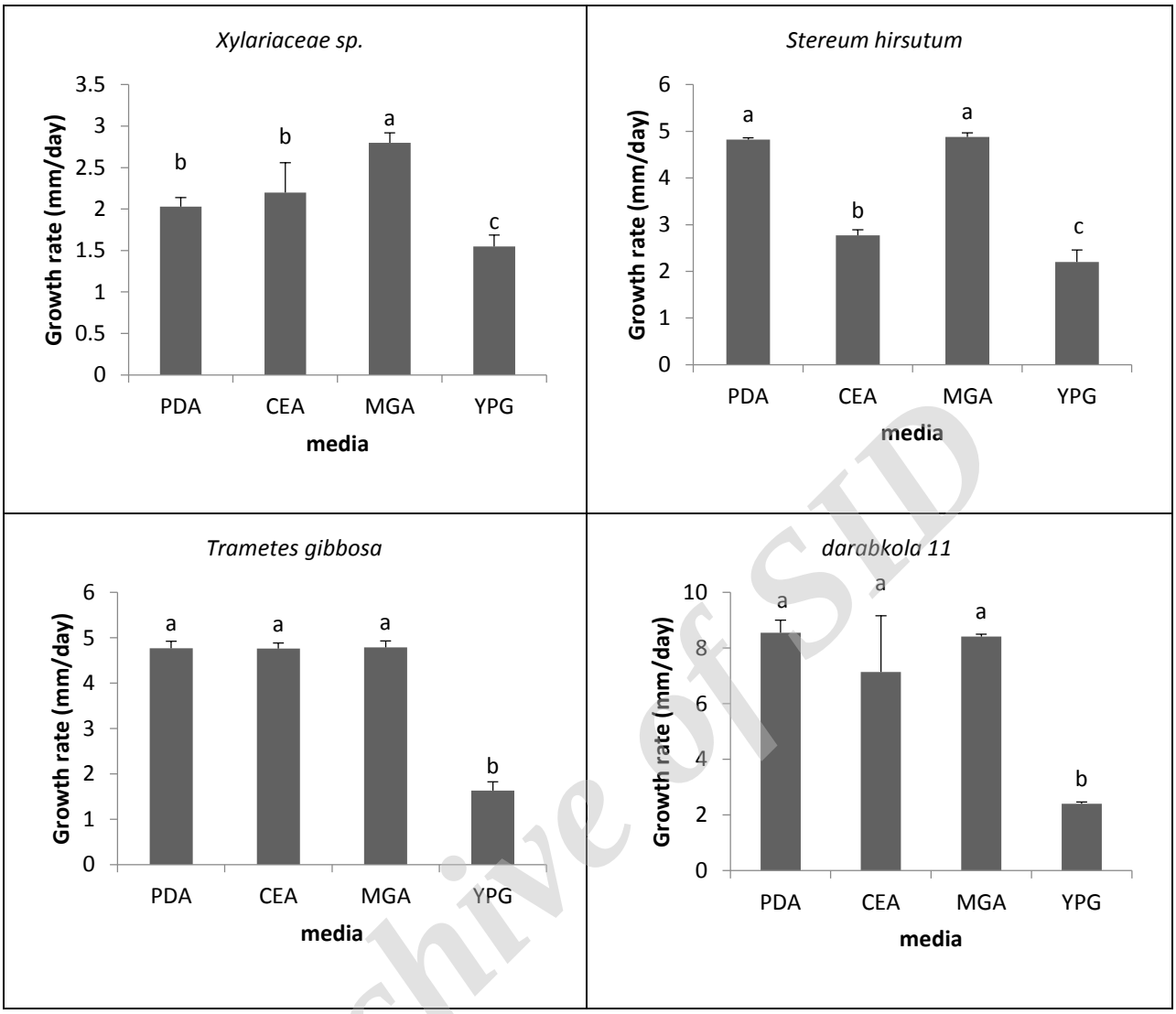
www.SID.ir



شکل۴-۱۸- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID

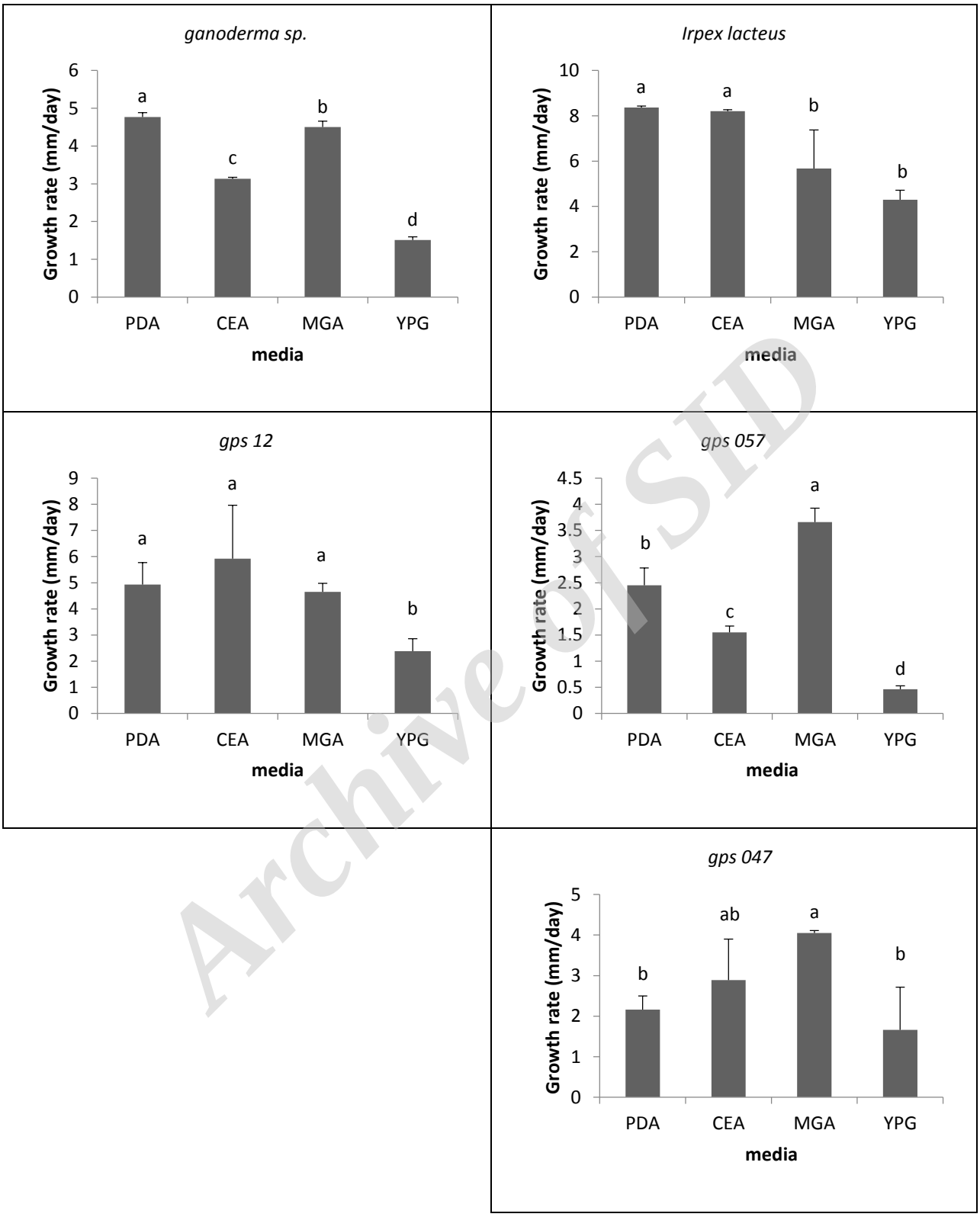
www.SID.ir



ادامه شکل۴-۱۸- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری د)

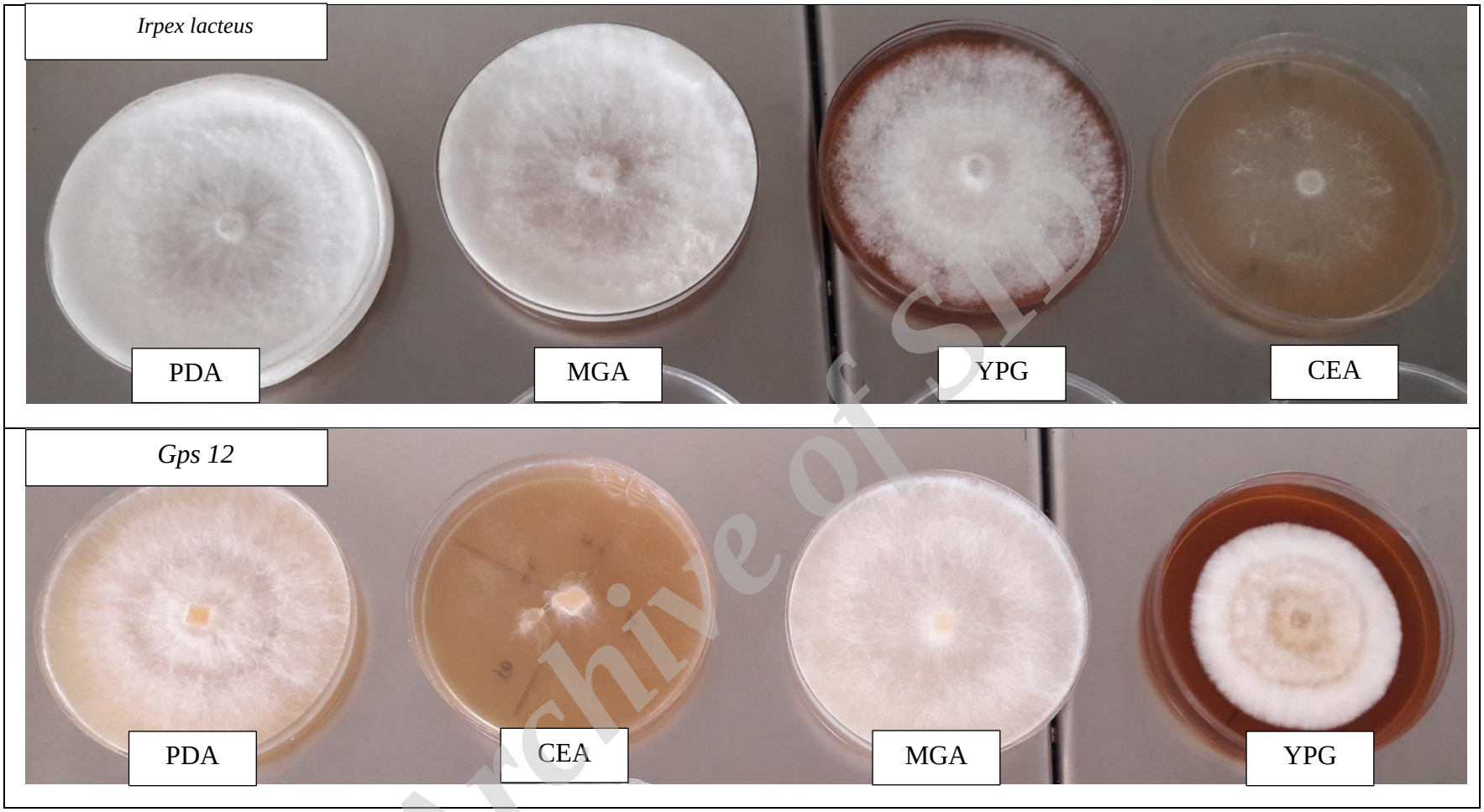
Archive of SID

www.SID.ir



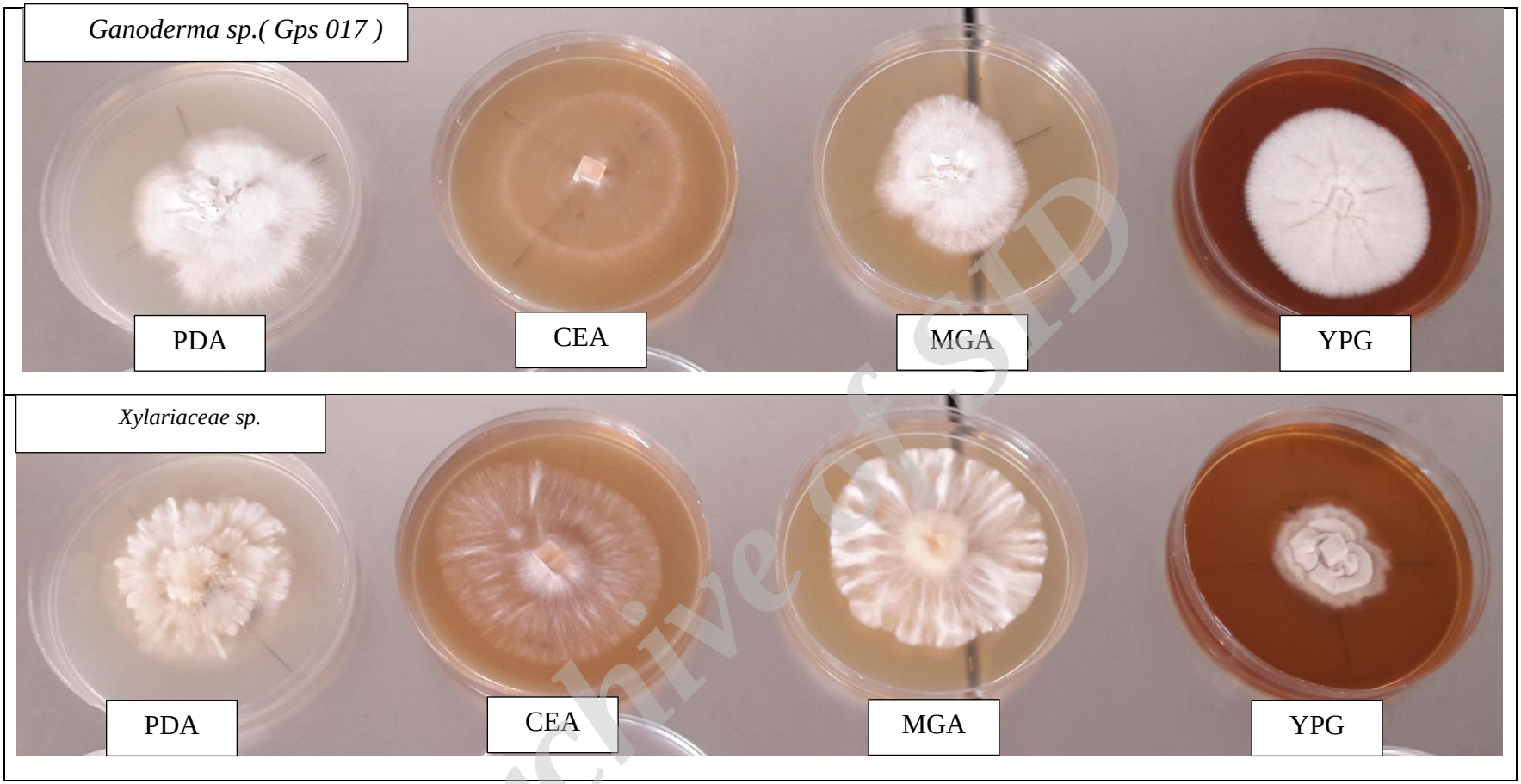
ادامه شکل۴-۱۸- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID
www.SID.ir



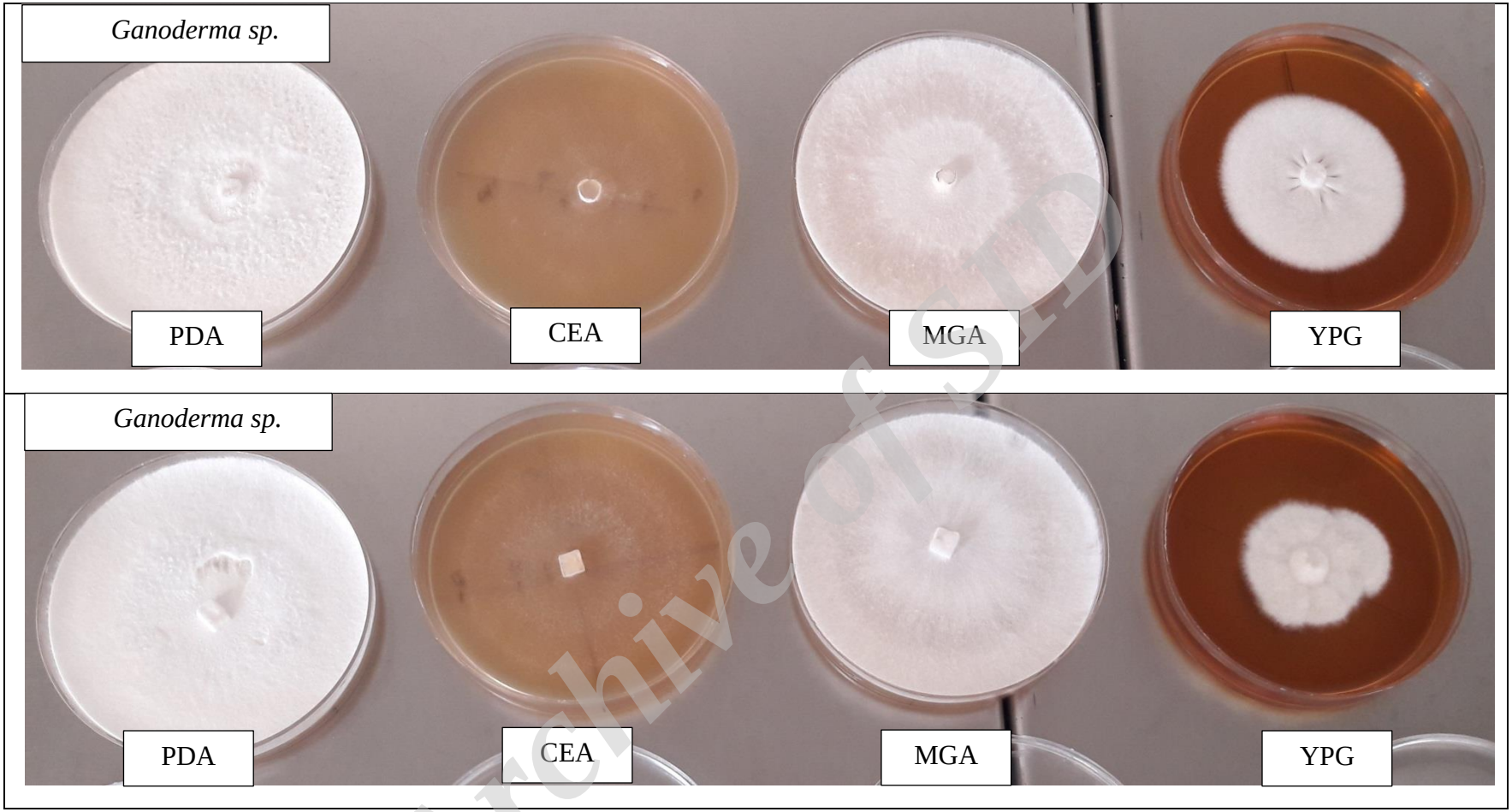
شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

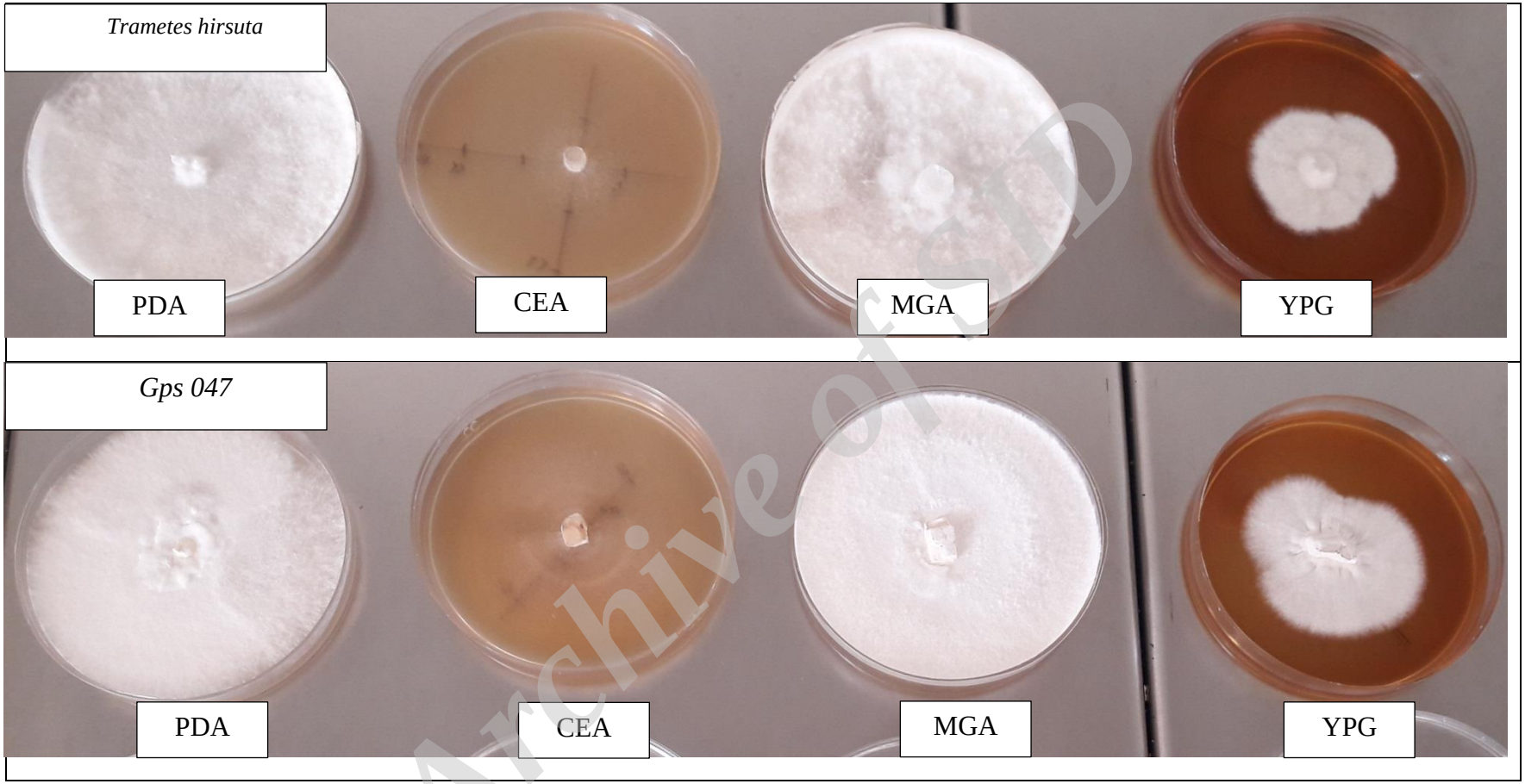
Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

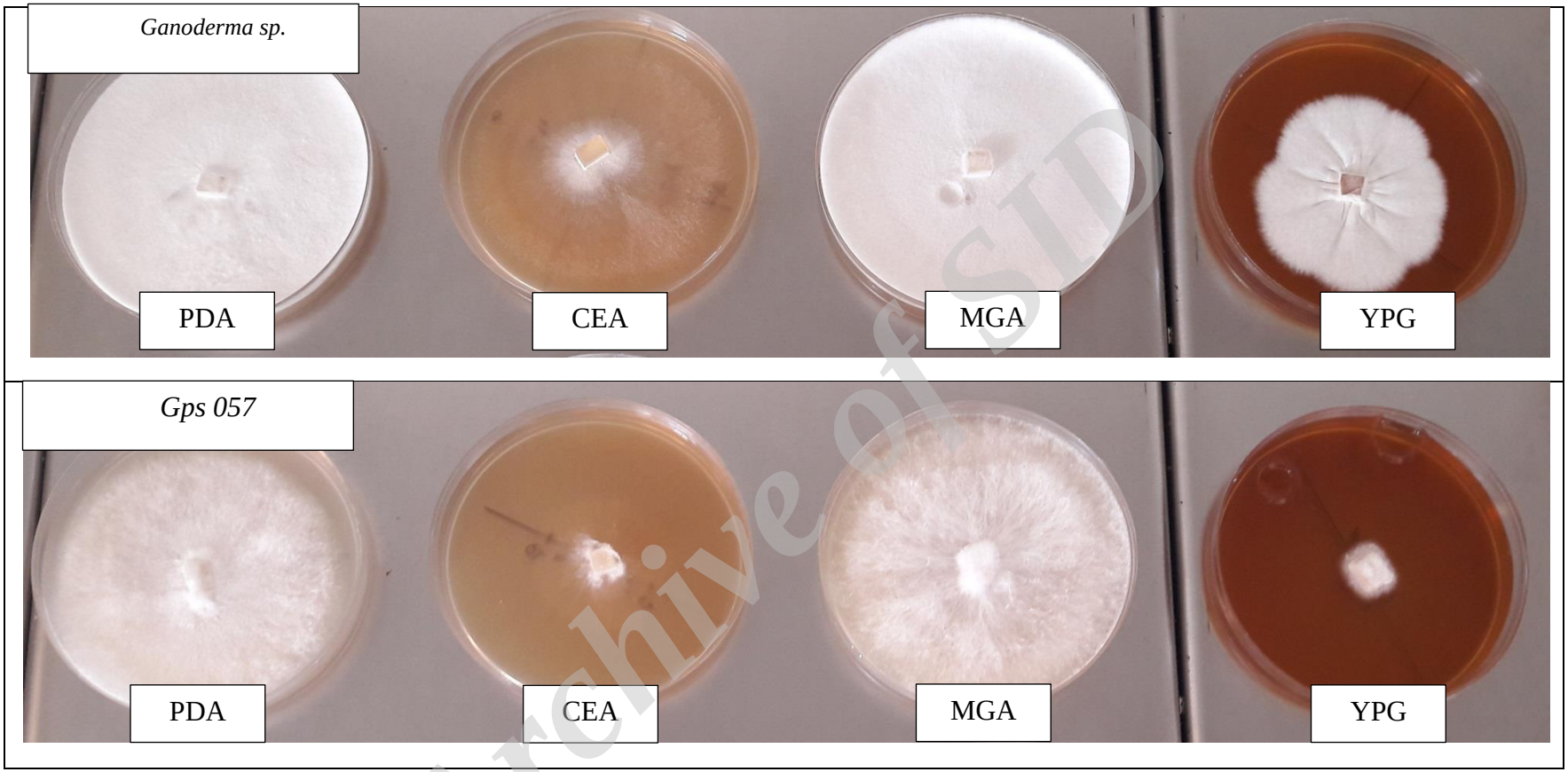
Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

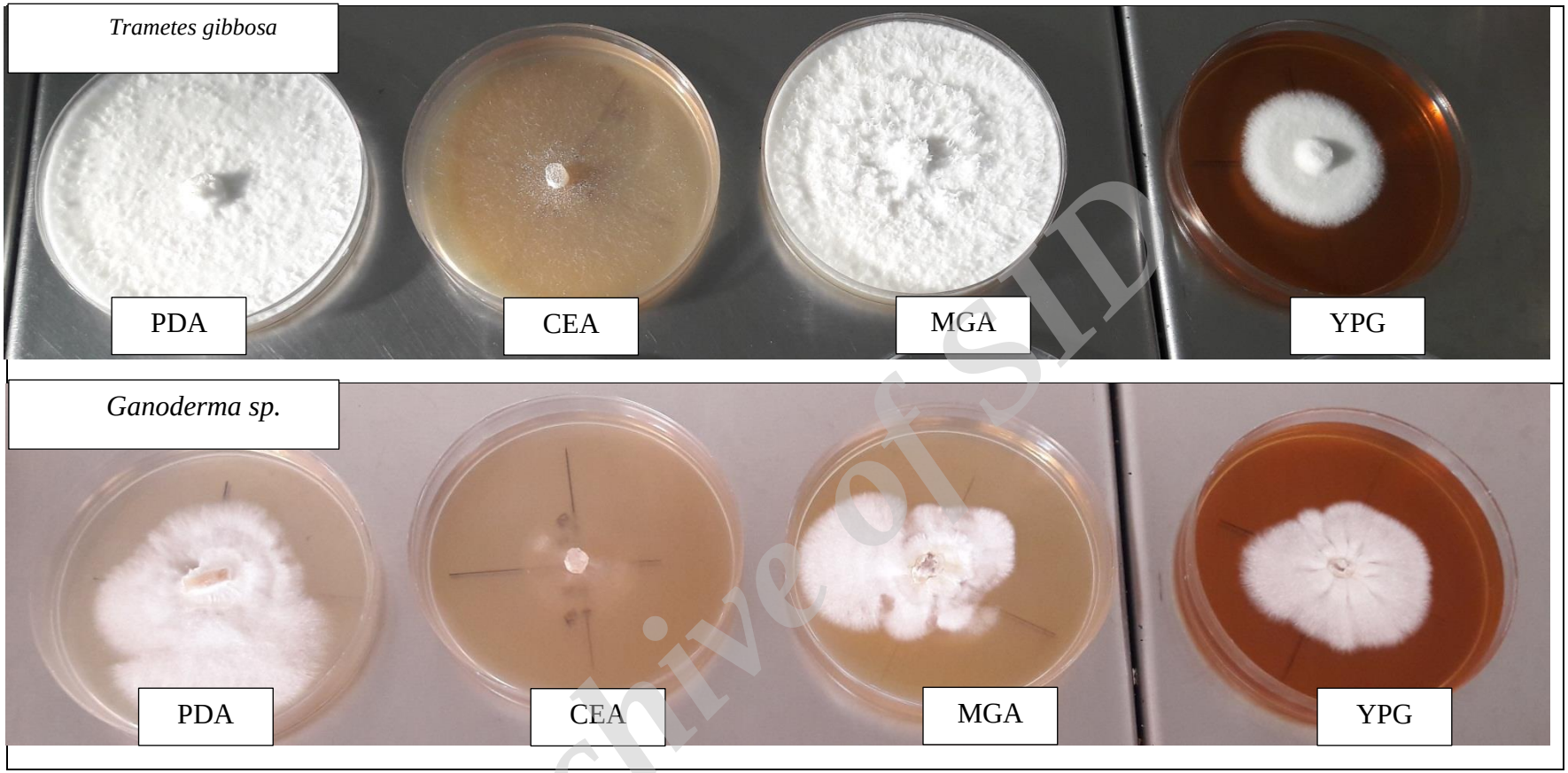
Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID

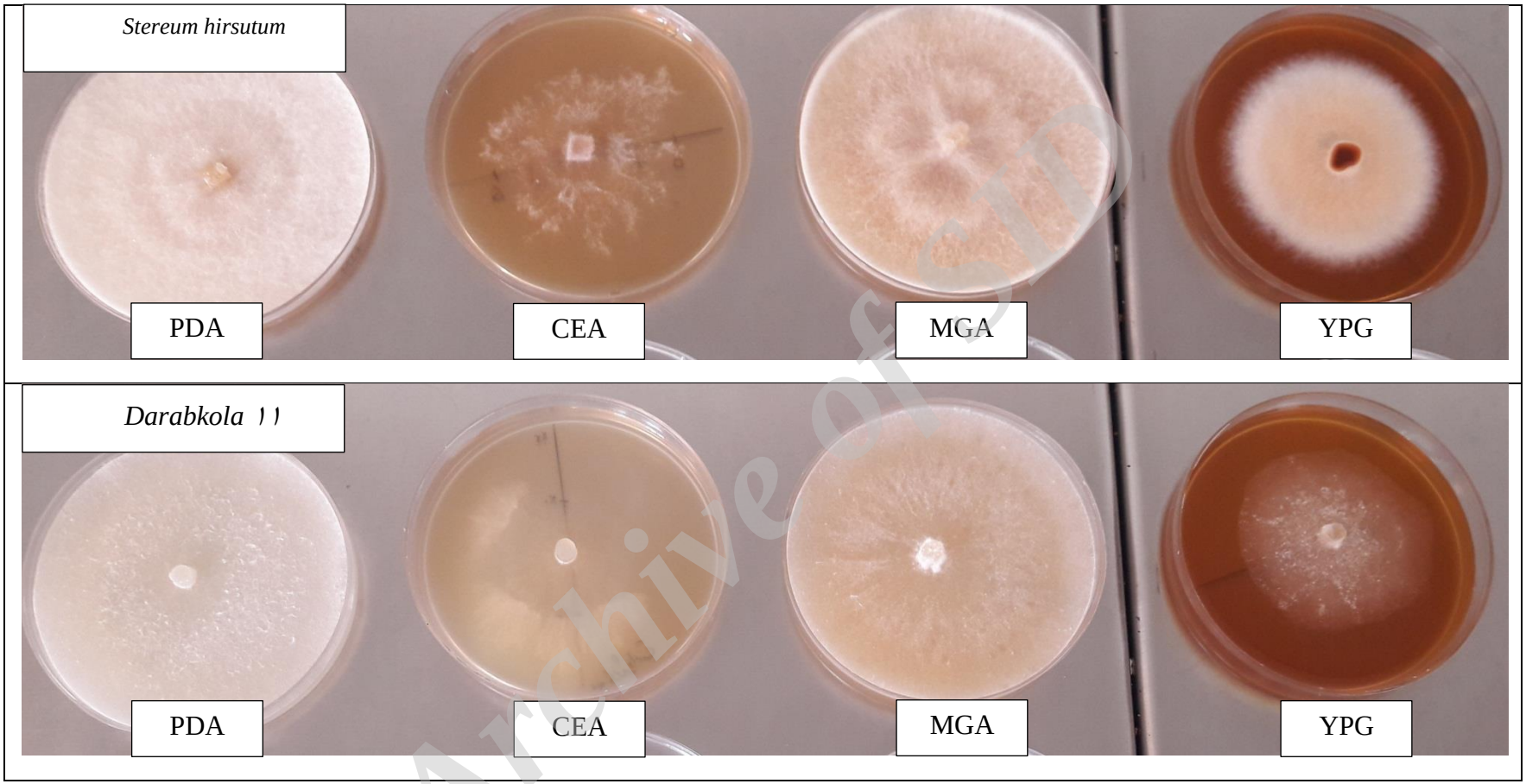
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

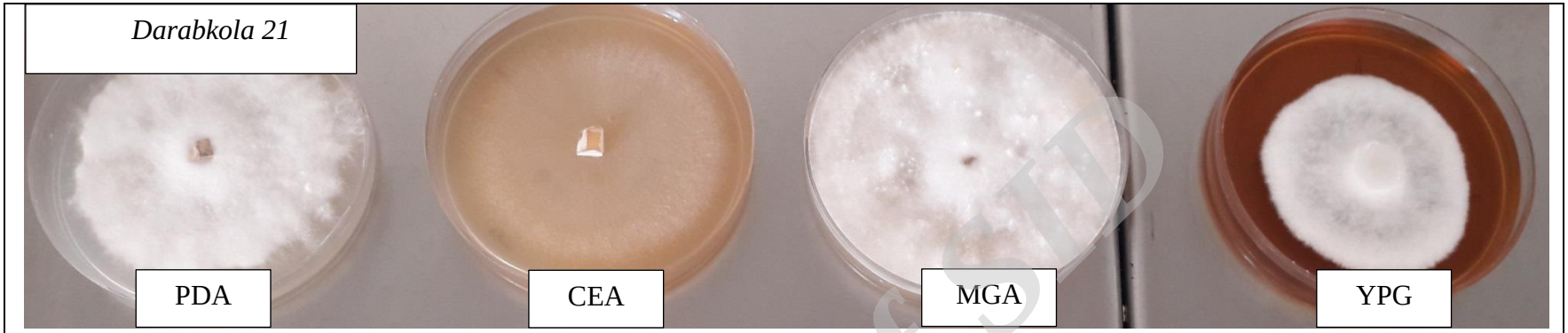
Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۱۹- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری د)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۱۴- **شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)**

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Irpex lacteus	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
Gps 12	PDA	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Ganoderma sp.(Gps 017)	PDA	رشته‌ای پنبه‌ای	۴	سفید	نامنظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	رشته‌ای پنبه‌ای	۴	سفید	نامنظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۴- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Xylariaceae sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	CEA	رشته‌ای	۳	سفید	منظم
	MGA	رشته‌ای پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	YPG	چرمی	۴	سفید	نامنظم
Ganoderma sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Ganoderma sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول۴-۱۴- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Trametes hirsuta	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
Gps 047	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
Ganoderma sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۲	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴-۱۴- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Gps 057	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
Trametes gibbosa	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۴	سفید	منظم
Ganoderma sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	CEA	بدون میسلیوم	۱	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول۴-۱۴- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۵ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری د)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم **	رنگ	شکل هندسی رشد
Stereum hirsutum	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۱	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Darabkola 11	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۱	سفید	منظم
	MGA	کرکی پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	کرکی	۴	سفید	منظم
Darabkola 21	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم

**: ۱: تراکم خیلی خیلی کم میسلیوم، ۲: تراکم خیلی کم میسلیوم، ۳: تراکم کم میسلیوم، ۴: تراکم متوسط میسلیوم، ۵: تراکم زیاد میسلیوم، ۶: تراکم خیلی زیاد میسلیوم

Archive of SID

www.SID.ir

شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری د)

Archive of SID
www.SID.ir

Ganoderma sp.

Ganoderma sp.(Gps 017)

Ganoderma sp.

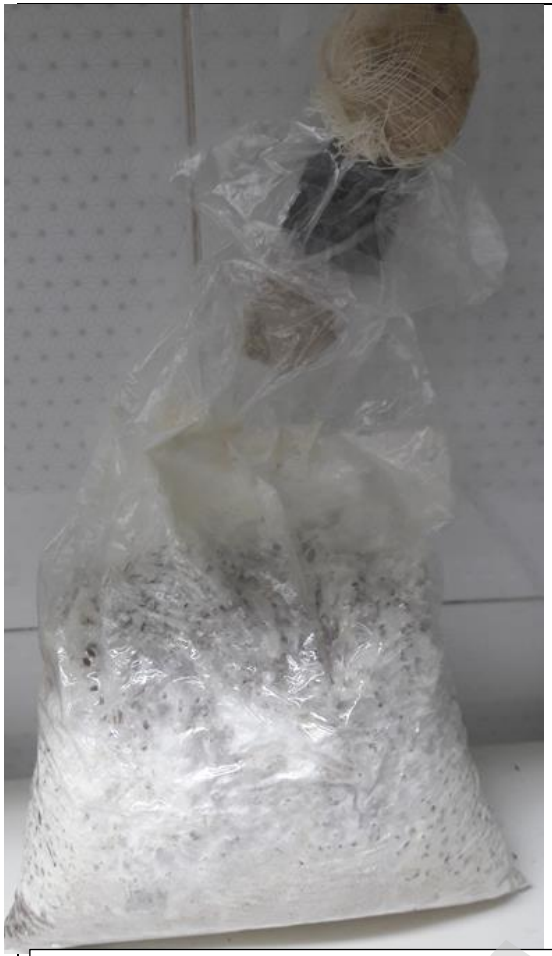
ادامه شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری د)

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم مختلف (سری د)

Archive of SID
www.SID.ir



Gps 057

Trametes gibbosa

Ganoderma sp.

ادامه شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونه‌های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری د)

Archive of SID

www.SID.ir

Stereum hirsutum

Darabkola 11

Darabkola 21

ادامه شکل ۴-۲۰- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری د)

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۴-۵- زراعی سازی سری ه (۱۱ نمونه)

۴-۴-۵-۱- بررسی شاخص‌های رشدی میسلیوم (سری ه)

جدول ۴-۱۵- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)

منبع تغییرات	درجه آزادی	*Irpex sp.*	184	208	*Hypholoma sp.*	*Trametes sp.*
محیط کشت	۳	۳/۷۳ **	۱/۴۴۲**	۰/۶۲۸**	۱/۷۱۳ **	۱۳/۹۷۲**
خطا	۸	۰/۰۳	۰/۰۱۶	۰/۰۱۱	۰/۰۰۶	۰/۰۱۷

**، * و ns به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

ادامه جدول ۴-۱۵- آنالیز واریانس میانگین مربعات سرعت رشد ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)

منبع تغییرات	درجه آزادی	128	172	*Trametes sp.*	*Pochonia chlamydosporia*	167	*Trametes versicolor*
محیط کشت	۳	۶/۹۴۵ **	۴/۲۳۴ **	۱۱/۵۹۰ **	۰/۰۹۰ ns	۲/۹۴۵ **	۳/۲۰۱ **
خطا	۸	۰/۰۱۳	۰/۰۳۴	۰/۰۱۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۹	۰/۰۲۶

**، * و ns به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار را نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

الف) سرعت رشد شعاعی میسلیوم

با توجه به نتایج آنالیز واریانس سرعت رشد شعاعی میسلیوم در محیط‌های کشت متفاوت، مشخص گردید که در اکثر جدایه‌های قارچ تفاوت معنی داری بین محیط‌کشت‌ها، در سطوح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۱ درصد وجود داشت (جدول ۴-۱۵). لذا نمودارهای تغییرات سرعت رشد شعاعی در اثر انواع محیط‌کشت برای این قارچ‌ها ترسیم شد (شکل ۴-۲۲). همچنین جدول مقایسه میانگین برای این نمونه‌ها ترسیم شد (جدول ۴-۱۷).

در قارچ *Irpex sp.* با توجه به نتایج مقایسه میانگین مشخص گردید که میسلیوم این قارچ در تمامی محیط کشت مورد استفاده، سرعت رشد خیلی سریع داشت (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز). بیشترین سرعت رشد شعاعی میسلیوم در قارچ ۱۸۴ در محیط کشت PDA (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) ثبت شد. سرعت رشد میسیلوم در دو محیط کشت عصاره کمپوست و MGA، سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) بود. سرعت رشد شعاعی میسلیوم قارچ *Hypholoma sp.* در سه محیط کشت PDA، MGA و YPG روزانه کمتر از ۱ میلیمتر در روز ثبت شد (خیلی کند). تنها در محیط کشت عصاره کمپوست سرعت رشد میسلیوم در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) ثبت شد.

سرعت رشدی میسلیوم قارچ ۲۰۸ در تمامی محیط کشت‌ها کم بود، به اینصورت که دو محیط کشت عصاره کمپوست و YPG، در کلاس رشدی خیلی کند (کمتر از ۱ میلیمتر در روز) و دو محیط کشت PDA و MGA در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. در قارچ *Trametes sp.* تمامی محیط-کشت‌ها به غیر از YPG در کلاس رشدی خیلی سریع قرار گرفتند. در این سه محیط کشت میسلیوم روزانه بیشتر از ۴ میلیمتر رشد داشت. این در حالیست که میسلیوم این قارچ در محیط کشت YPG روزانه کمتر از ۱ میلیمتر رشد داشت. سرعت رشد میسلیوم در قارچ ۱۲۸ نیز روندی مشابه قارچ *Trametes sp.* نشان داد، با این

Archive of SID

www.SID.ir

تفاوت که سرعت رشد میسلیوم در محیط کشت YPG در این قارچ در کلاس رشدی کند قرار گرفت. سرعت رشد در سه محیط کشت PDA، عصاره کمپوست و MGA در قارچ ۱۷۲ در کلاس رشدی سریع (۳ الی ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفت. میسلیوم در محیط کشت YPG، روزانه کمتر از ۱ میلیمتر در روز رشد داشت.

سرعت رشد شعاعی میسلیوم در تمامی محیط‌کشت‌های مورد استفاده در آزمایش در قارچ *Trametes sp.* روانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز ثبت گردید. در قارچ ۱۶۷ نیز روندی مشابه قارچ *Trametes sp.* مشاهده شد و تمامی محیط کشت‌ها در کلاس رشدی خیلی سریع (بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفتند. دو محیط کشت PDA و MGA در قارچ (۱۰۷) *Trametes versicolor* با توجه به نتایج بدست آمده در کلاس رشدی خیلی سریع (روانه بیشتر از ۴ میلیمتر در روز) قرار گرفتند.سرعت رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست در این قارچ روزانه ۳ الی ۴ میلیمتر در روز ثبت شد. در محیط کشت YPG سرعت رشد شعاعی میسلیوم در کلاس رشدی متوسط قرار گرفت. در قارچ *Pochonia chlamydosporia* سرعت رشد میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها در کلاس رشدی کند (۱ الی ۲ میلیمتر در روز) قرار گرفت.

ب) شاخص‌های رشدی کیفی میسلیوم

بافت، رنگ و شکل هندسی رشد میسلیوم قارچ (۱۴۶) *Irpex sp.* در تمامی محیط‌کش‌های مورد استفاده در آزمایش به ترتیب، رشته‌ای کرکی، سفید و منظم بود. تراکم میسیلوم در تمامی محیط‌کشت‌ها به غیر از عصاره کمپوست، زیاد بود. علاوه بر این در تمامی محیط کشت‌ها سرعت رشد میسیلوم در کلاس رشدی سریع قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

بافت میسلیوم در قارچ ۱۸۴ در دو محیط کشت PDA و YPG به صورت پنبه‌ای، در محیط کشت عصاره کمپوست به صورت کرکی و در محیط کشت MGA به صورت پنبه‌ای رشته‌ای بود. تراکم میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست کم و در محیط کشت‌های دیگر زیاد بود. شکل هندسی رشد و رنگ میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها به ترتیب منظم و سفید بود. سرعت رشد میسلیوم نیز در محیط کشت PDA، خیلی سریع؛ در محیط کشت عصاره کمپوست و MGA، سریع و در محیط کشت YPG، متوسط بود.

در قارچ *Hypholoma sp.* بافت میسلیوم در دو محیط کشت PDA و عصاره کمپوست به صورت کرکی و در محیط کشت MGA به صورت پنبه‌ای بود. تراکم میسلیوم در سه محیط کشت PDA، CEA و MGA به ترتیب، متوسط، کم و زیاد بود. سرعت رشد میسیلوم در هر سه محیط کشت در دو کلاس رشدی کند و خیلی کند قرار کرفت.

دو قارچ (۱۱۹) *Trametes sp.* و ۱۲۸ شاخص‌های رشدی مشابه یکدیگر داشتند. تراکم میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست، کم و در سه محیط کشت دیگر، زیاد بود. بافت میسلیوم در دو محیط کشت PDA و YPG به صورت پنبه‌ای و و در محیط کشت MGA به صورت پنبه‌ای کرکی بود. بافت میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست به صورت کرکی بود. سرعت رشد شعاعی میسلیوم در دو قارچ *Trametes sp.* و ۱۲۸ در تمامی محیط کشت‌ها به غیر از YPG، در کلاس رشدی خیلی سریع قرار گرفتند.

شاخص‌های کیفی میسیلوم در دو محیط کشت PDA و عصاره کمپوست در قارچ ۱۷۲ مشابه یگدیکر بود. بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای رشته‌ای، تراکم میسیلوم زیاد و سرعت رشدی میسلیوم سریع بود. همچنین رنگ میسلیوم سفید و شکل هندسی رشد منظم بود. در دو محیط کشت MGA و YPG بافت میسلیوم به

Archive of SID

www.SID.ir

صورت پنبه‌ای، تراکم میسلیوم زیاد، رنگ میسلیوم سفید و شکل هندسی رشد میسلیوم منظم بود، اما سرعت رشد میسیلوم در محیط کشت MGA در کلاس رشدی سریع و در محیط کشت YPG در کلاس رشدی خیلی کند قرار گرفت.

در قارچ *Trametes sp.* بافت میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست به صورت کرکی و تراکم آن کم بود. اما در سه محیط کشت دیگر بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود. با اینحال سرعت رشد میسیلیم در تمامی محیط کشت‌ها در کلاس رشدی خیلی سریع قرار داشت؛ علاوه براین شکل هندسی رشد، منظم و رنگ میسلیوم سفید بود.

در تمامی محیط کشت‌های مورد استفاده در آزمایش سرعت رشد میسلیوم در قارچ ۱۶۷ در کلاس رشدی خیلی سریع قرار گرفت. همچنین شکل هندسی رشد، منظم و رنگ میسیلوم سفید بود. اما بافت میسلیوم در محیط کشت عصاره کمپوست، رشته‌ای و تراکم میسیلیوم متوسط بود، درحالیکه در سه محیط کشت دیگر بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود.

در قارچ *Trametes versicolor* بافت میسیلوم قارچ در محیط کشت عصاره کمپوست به صورت کرکی، تراکم میسلیوم خیلی خیلی کم و سرعت رشد در کلاس رشدی سریع قرار گرفت. در مقابل در سه محیط کشت دیگر بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و تراکم میسلیوم زیاد بود. قابل ذکر است که سرعت رشد میسلیوم در دو محیط کشتت PDA و MGA در کلاس رشدی خیلی سریع و در محیط کشت YPG در کلاس رشدی متوسط قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

در قارچ *Pochonia chlamydosporia* در محیط کشت عصاره کمپوست بافت میسلیوم به صورت کرکی پنبه‌ای و شکل هندسی رشد نامنظم بود. در سه محیط کشت دیگر بافت میسلیوم به صورت پنبه‌ای و شکل هندسی رشد میسلیوم منظم بود. تراکم میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها زیاد، رنگ آن سفید و سرعت رشد میسلیوم روزانه کمتر از ۱ میلیمتر بود.

در قارچ ۲۰۸، بافت میسلیوم در تمامی محیط کشت‌ها پنبه‌ای بود. اما تراکم میسلیوم در دو محیط کشت PDA و MGA، زیاد بود. محیط کشت YPG تراکم میسلیومی کمی داشت و در محیط کشت عصاره کمپوست تراکم میسلیوم متوسط بود. رنگ میسلیوم در محیط کشت PDA، خاکستری بود. میسلیوم در دو محیط کشت عصاره کمپوست و MGA، رنگ سفید طوسی داشت. همچنین در محیط کشت YPG رنگ میسلیوم طوسی بود. سرعت رشد میسلیوم در دو محیط کشت MGA و PDA در کلاس رشدی کند و دو دو محیط کشت دیگر (CEA و YPG) در کلاس رشدی خیلی کند قرار گرفت.

۴-۴-۵-۲- رشد اسپاون (سری ه)

با توجه به وضعیت رشد رویشی میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون مشخص گردید که اسپان دانه‌های گندم در قارچ ۲۰۸ پس از ۱۱ روز رشدی نداشت. اما اسپاون دانه‌های گندم در قارچ‌های ۱۸۴، *Pochonia chlamydosporia* ، ۱۲۸، *Irpex sp.*، ۱۶۷، *Trametes versicolor* ، *Trametes sp.* ، *Trametes sp.* پس از ۱۱ روز رشد مناسبی را نشان داد. اسپان دانه‌های گندم در قارچ ۱۷۲ و *Hypholoma sp.* پس از یازده روز رشد کمی داشت (شکل ۴-۲۴).

Archive of SID

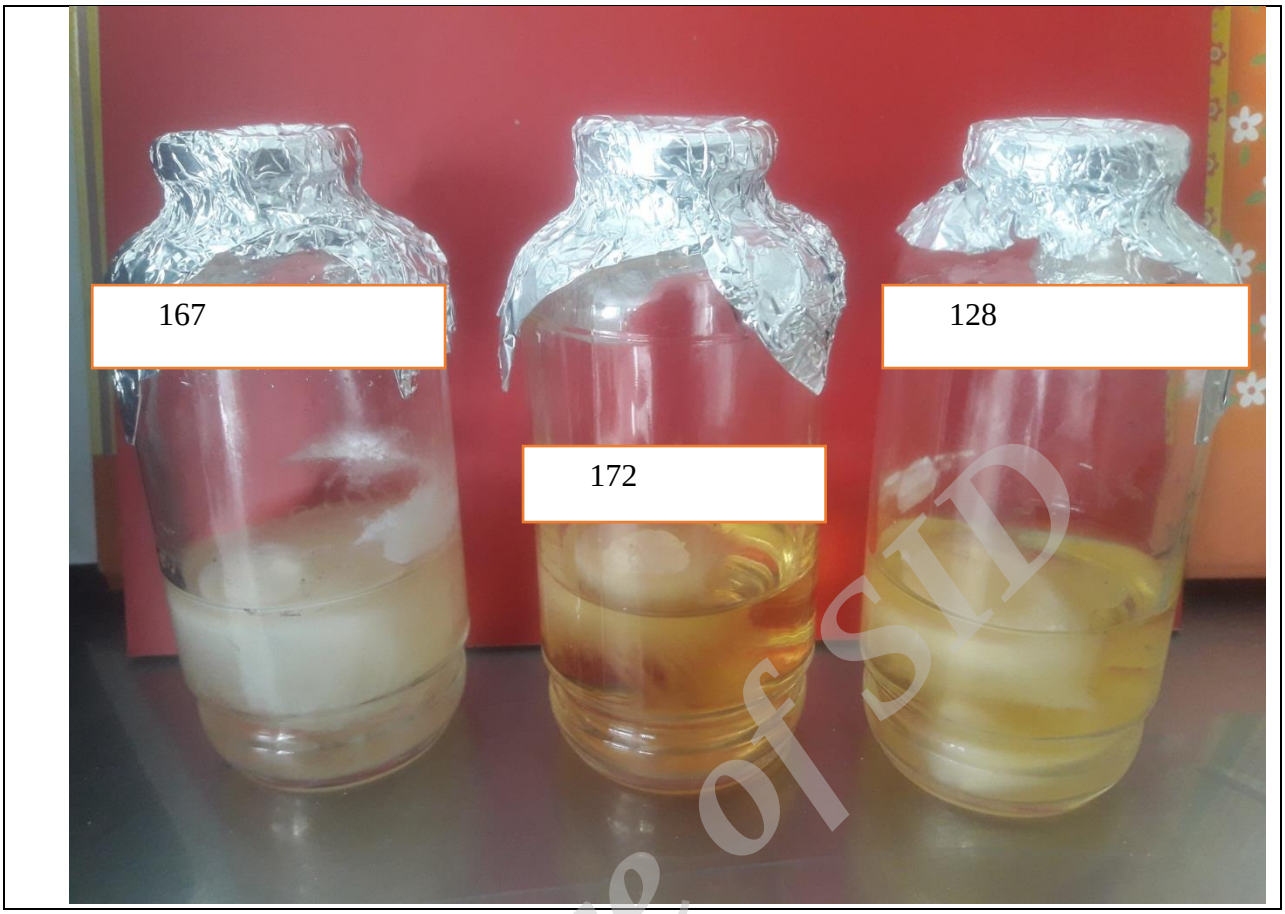
www.SID.ir

۴-۴-۵-۳- کشت معلق میسلیوم (سری ه)

کشت‌های تعلیقی جدایه‌های سری ه در حجم ۴۰ میلی‌لیتر در انکوباتور شیکردار مورد بررسی قرار گرفتند. پس از خروج ویال‌ها از انکوباتور، مشاهدات نشان داد تفاوت بین سرعت رشد میسلیومی (از نظر پر کردن محیط مایع) در این سری مشاهده نشد و رشد میسلیوم تمامی نمونه‌ها پس از ۱۳ روز ببرسی شد. رشد میسلیوم در گونه‌های مختلف قارچ، متفاوت بود. در برخی از آن‌ها میسلیوم به طور یکنواخت و متراکم سراسر محیط کشت مایع را پر کرد و در حالی که رشد میسلیوم برخی گونه‌ها به صورت پراکنده و کم تراکم بود. پس از پایان بررسی و مشاهدات، محیط مایع کشت از طریق کاغذ صافی استریل حذف و میسلیوم‌ها از روی کاغذ صافی در شرایط استریل جمع آوری و در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه‌سانتیگراد خشک شدند. در انتها وزن میسلیوم خالص محاسبه گردید و جدایه‌ها از این نظر مورد بررسی قرار گرفتند. وزن میسلیوم خالص در حجم ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع، ۲/۲۴ گرم تا ۷/۵۹ گرم متغیر بود. کمترین توده میسلیومی مربوط به گونه‌ی *Hypholoma sp.* (۲/۲۴ گرم) و بیشترین وزن توده میسلیومی مربوط به گونه‌ی ۱۶۷ (۷/۵۹ گرم) بود ($p < 0.05$) (شکل ۴-۲۱).

Archive of SID

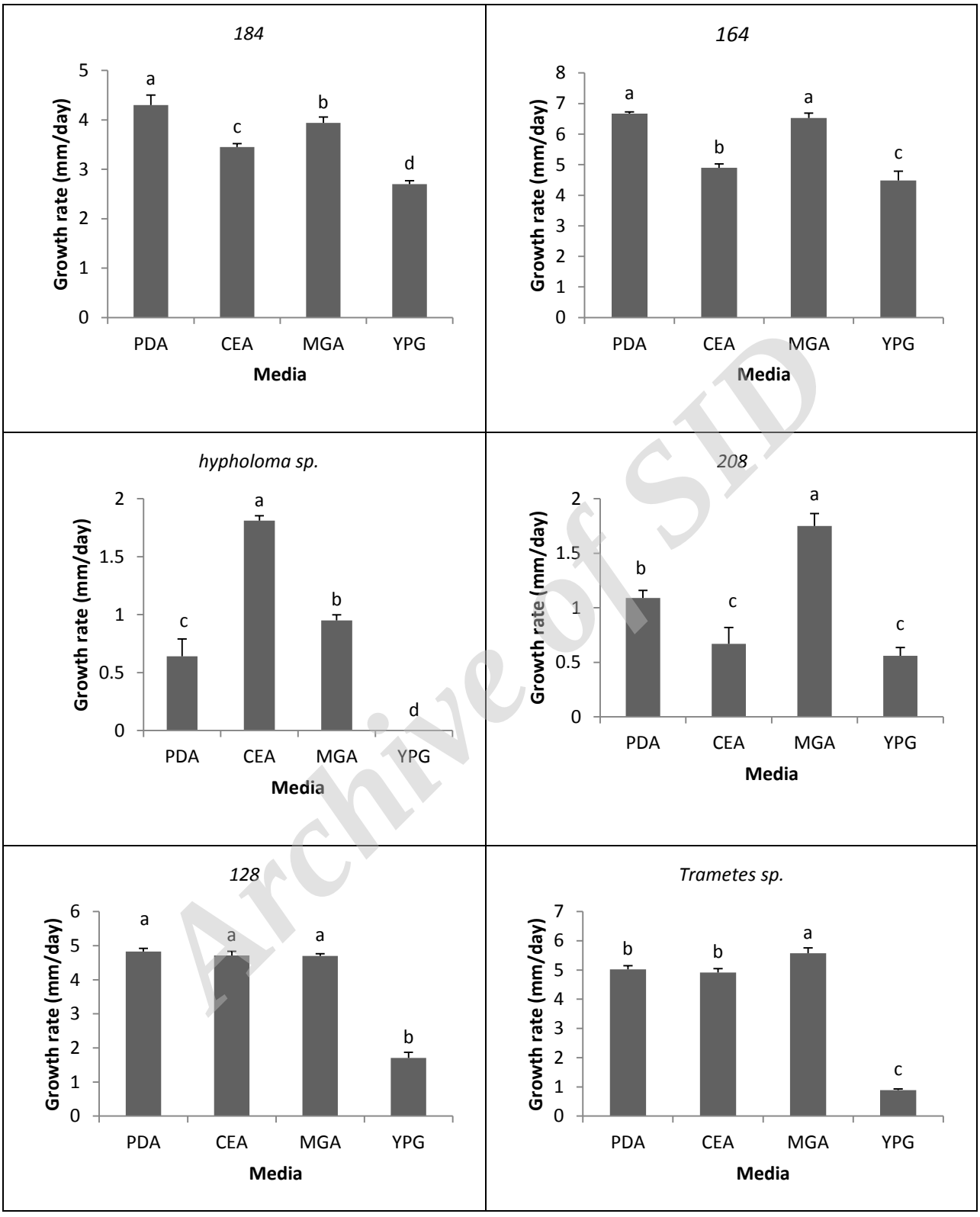
www.SID.ir



شکل ۴-۲۱- کشت معلق میسلیوم برخی از جدایه‌های قارچ‌های بومی (سری ه)

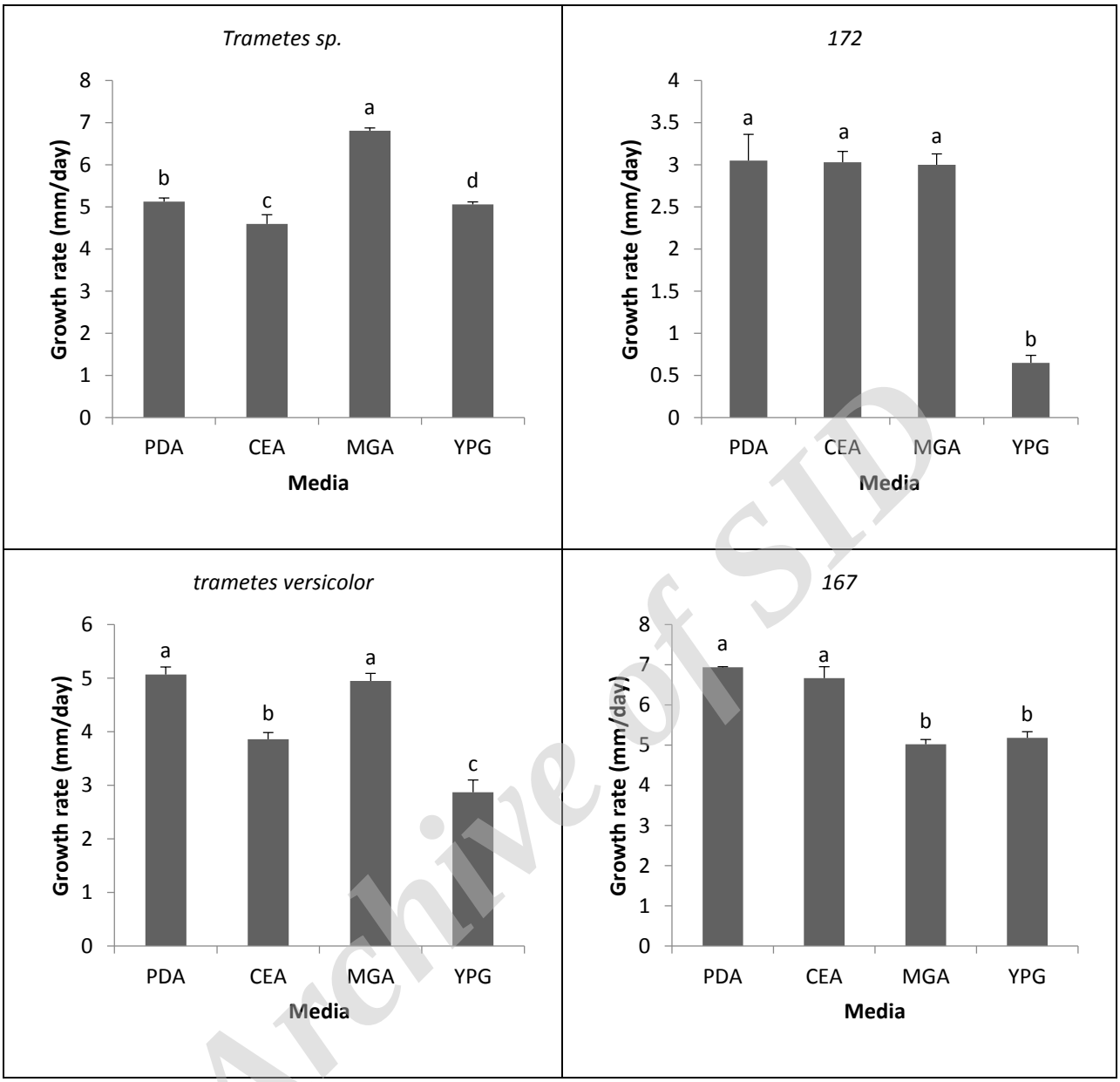
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۲۲- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف(سری ه)

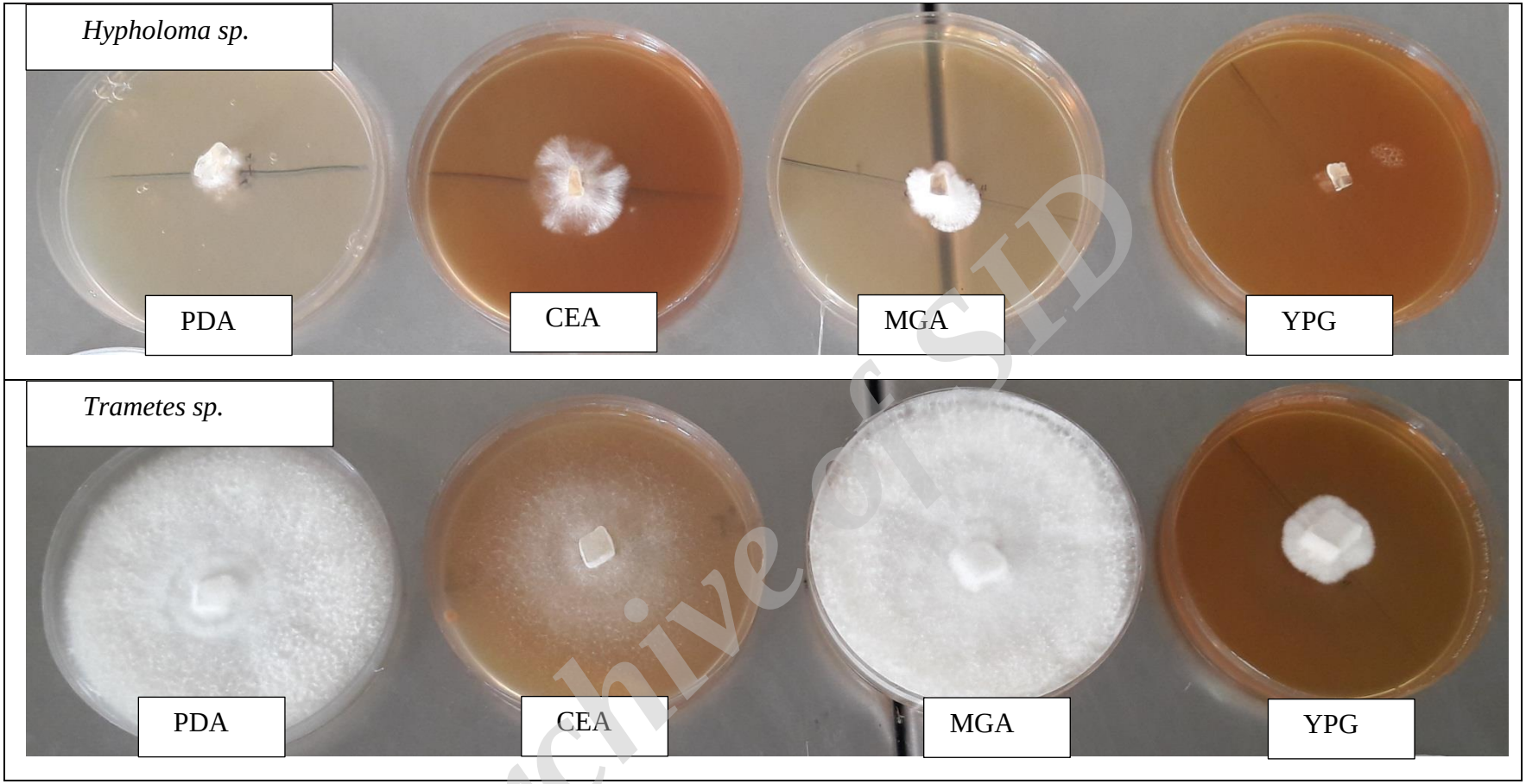
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۴-۲۲- نمودار تغییرات سرعت رشد شعاعی میسلیوم در اثر محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

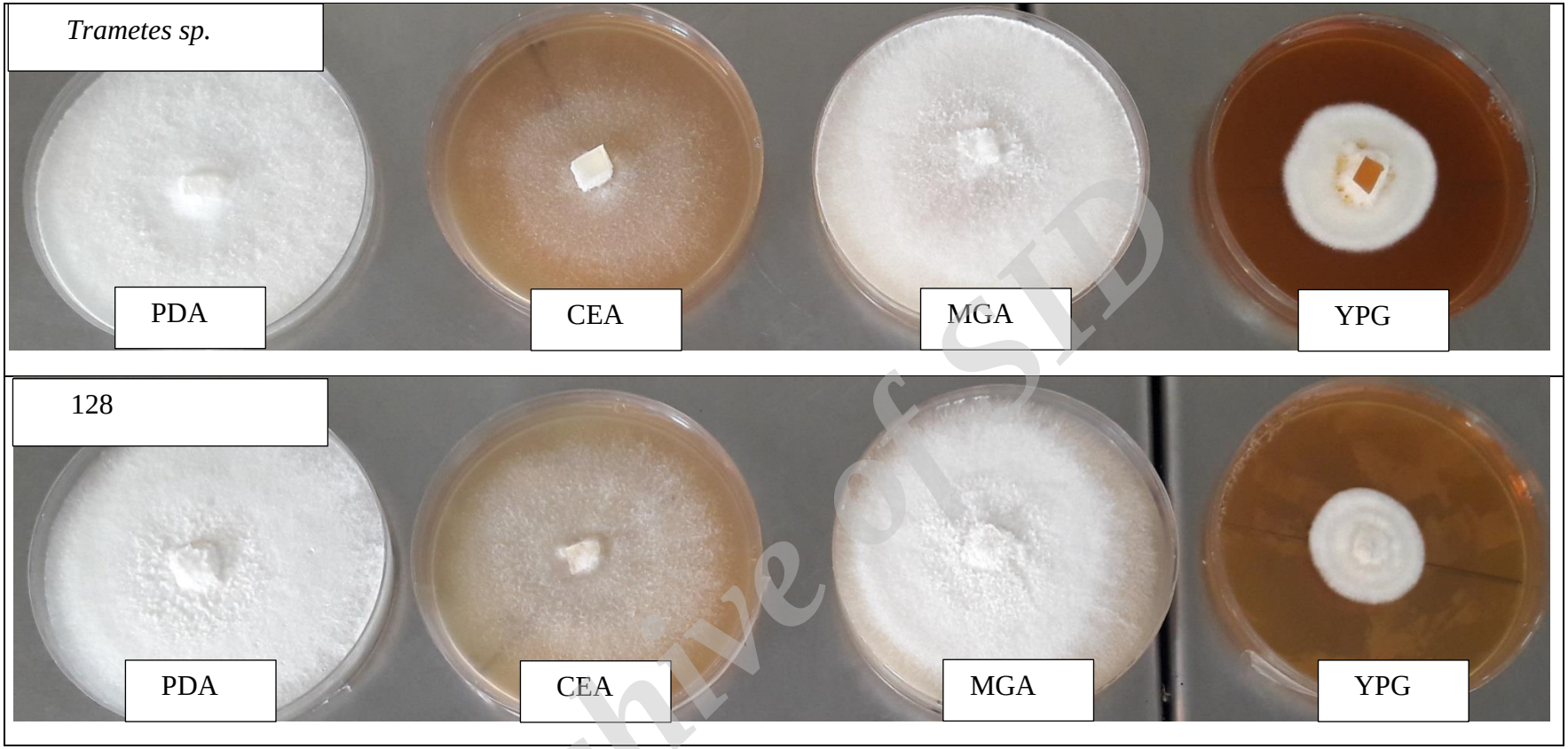
www.SID.ir



شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

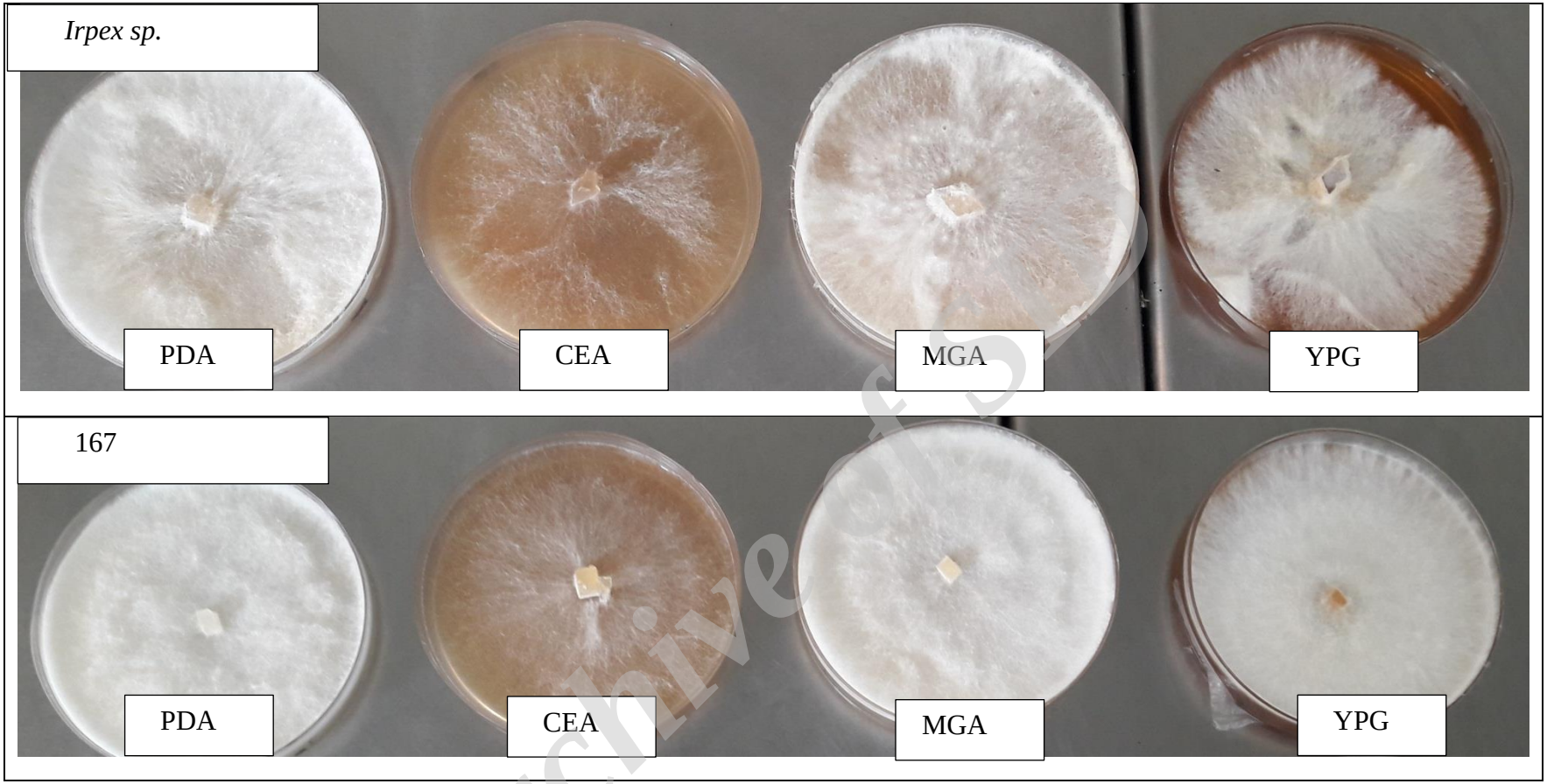
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

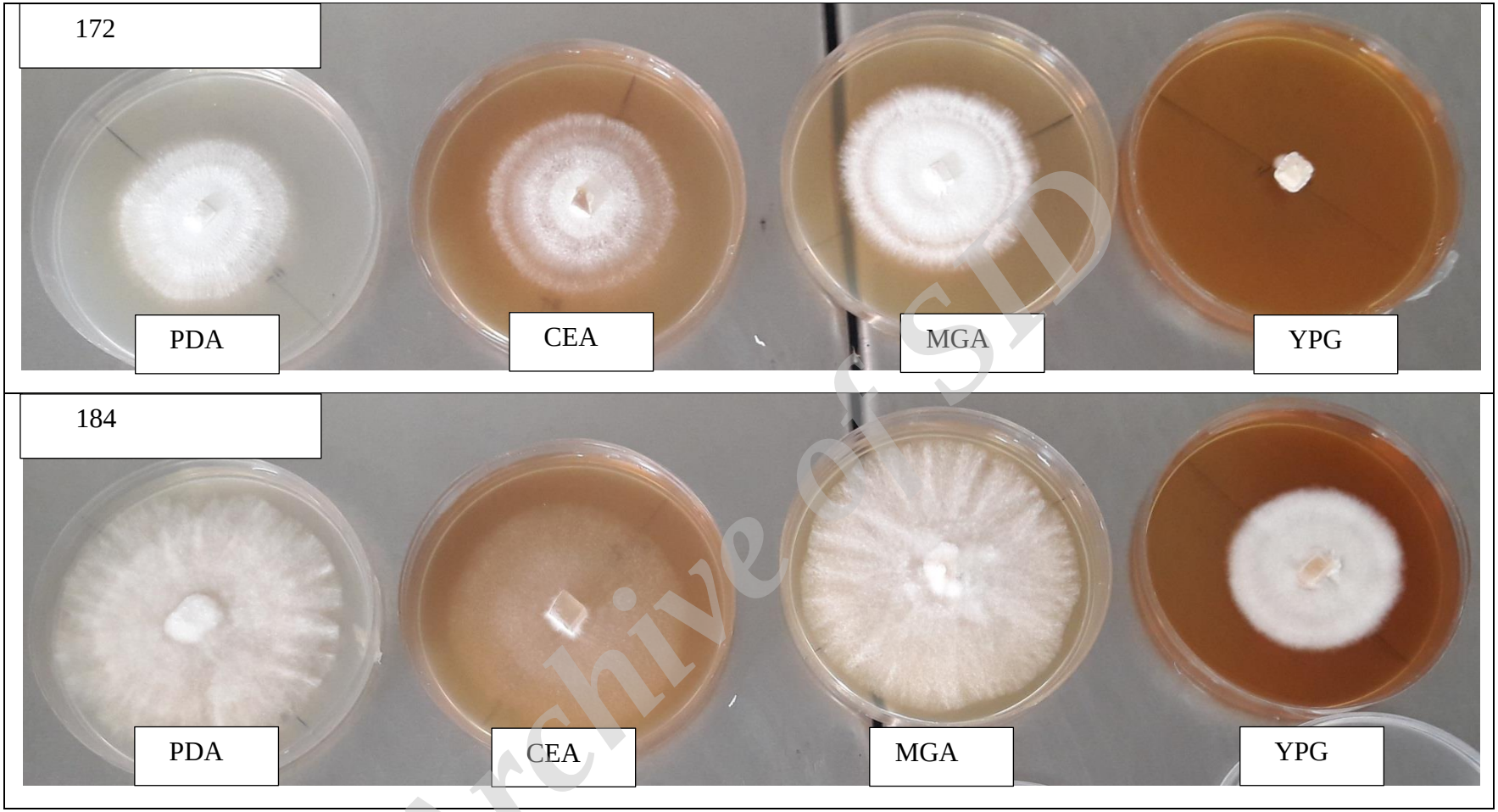
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

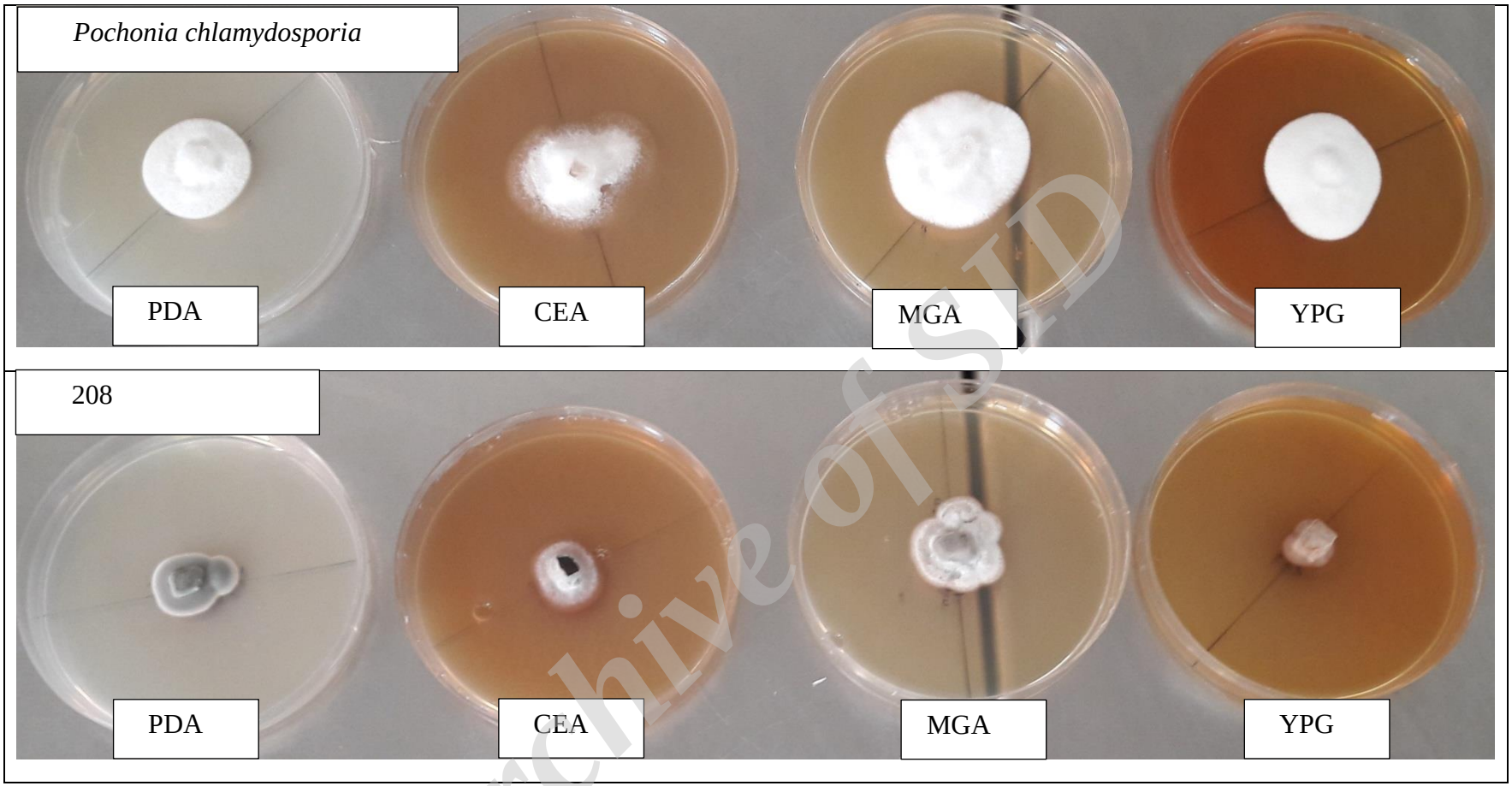
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

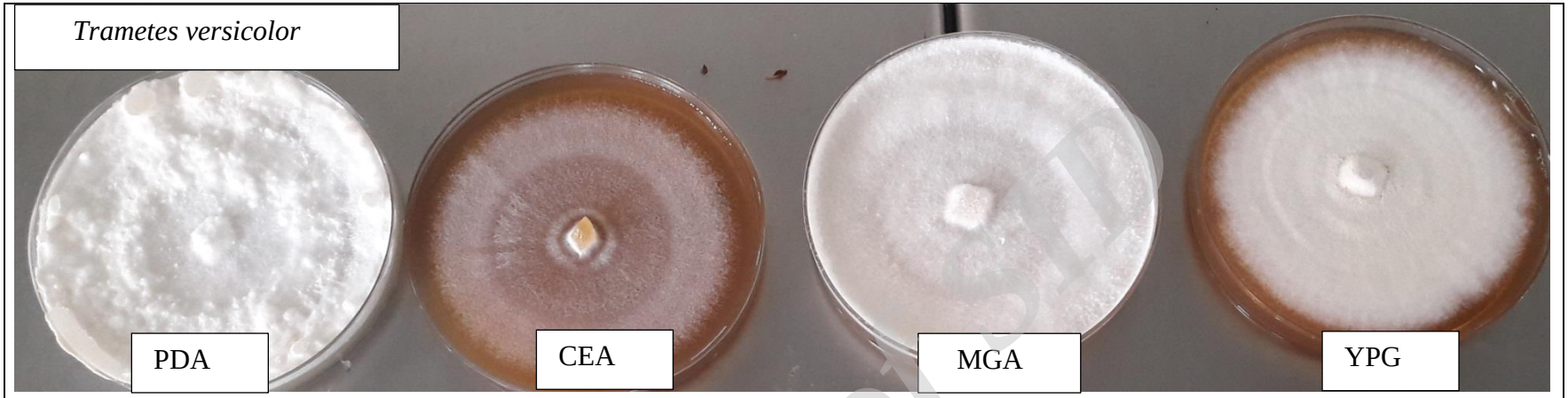
www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

www.SID.ir



ادامه شکل ۴-۲۳- شاخص‌های رشدی میسلیوم برخی از قارچ بومی در محیط‌های کشت مختلف (سری ه)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴-۱۶- **شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)**

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Irpex sp.	PDA	رشته‌ای کرکی	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	رشته‌ای کرکی	۵	سفید	منظم
	YPG	رشته‌ای کرکی	۵	سفید	منظم
184	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای رشته‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Hypholoma sp.	PDA	کرکی	۴	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	YPG	–	–	سفید	منظم

*: خیلی کند: سرعت رشد کمتر از ۱ میلیمتر در روز، کند: سرعت رشد ۱الی ۲ میلمتر در روز، متوسط: سرعت رشد ۲ الی ۳ میلیمتر در روز، سریع: سرعت رشد ۳ الی۴ میلیمتر در روز، خیلی سریع: سرعت رشد بیشتر از ۴ میلیمتر در روز.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴-۱۶- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای کرکی	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
128	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای کرکی	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
172	PDA	پنبه‌ای رشته‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	پنبه‌ای رشته‌ای	۵	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴-۱۶- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Trametes sp.	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۳	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
167	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	رشته‌ای	۴	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
Trametes versicolor	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی	۱	سفید	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴-۱۶- شاخصه‌های رشدی بررسی شده ۱۱ جدایه قارچ وحشی تحت تاثیر محیط کشت‌های متفاوت (سری ه)

قارچ	محیط کشت	بافت	تراکم	رنگ	شکل هندسی رشد
Pochonia chlamydosporia	PDA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	CEA	کرکی پنبه‌ای	۵	سفید	نامنظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۵	سفید	منظم
208	PDA	پنبه‌ای	۵	خاکستری	نامنظم
	CEA	پنبه‌ای	۴	سفیدطوسی	منظم
	MGA	پنبه‌ای	۵	سفیدطوسی	منظم
	YPG	پنبه‌ای	۳	طوسی	منظم

Archive of SID

www.SID.ir

Trametes sp.

Trametes sp.

Trametes versicolor

شکل ۴-۲۴- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ه)

Archive of SID

www.SID.ir

167

Irpex sp.

128

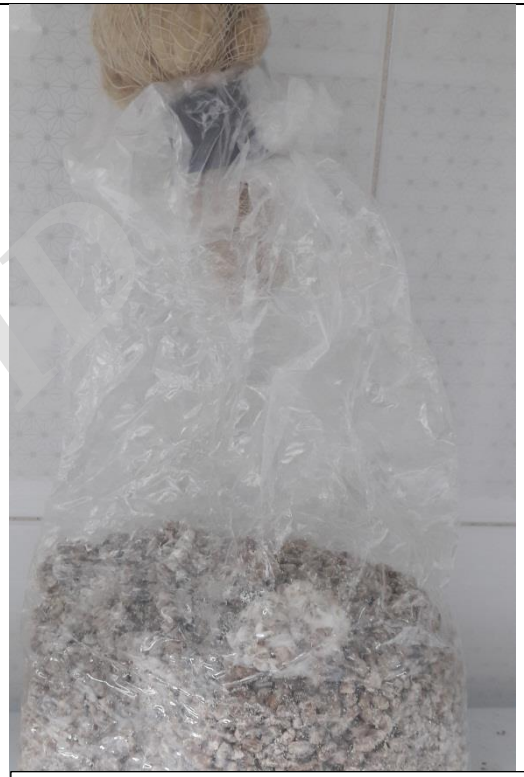
ادامه شکل ۴-۲۴- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ه)

Archive of SID

www.SID.ir

Pochonia chlamydosporia

184



172

ادامه شکل ۴-۲۴- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه های گندم (سری ه)

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه شکل ۴-۲۴- تصاویر رشد گونه های قارچ بومی مورد آزمایش در اسپان دانه‌های گندم (سری ه)

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴-۱۷- مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیوم (میلی‌متر در روز) جدایه‌های قارچ بومی تحت تاثیر محیط کشت‌های مختلف (در هر سری الف تا ه، نمونه‌هایی آورده شده‌اند که نوع محیط کشت اثر معنی‌داری بر روی سرعت رشد شعاعی آنها داشته است. حروف آماری متفاوت در هر ستون نشاندهنده اختلاف آماری در سطح کمتر از ۰/۰۱ هستند)

محیط کشت	*Donkia pulcherima* (سری الف)	*Lenzites tricolor* (سری الف)	*Hohenbuehelia auriscapium* (سری الف)	*Hypholma fasciculare* (سری الف)	*Trametes sp* (سری ب)	*Marasmiellus sp* (سری ب)	*Trametes sp* (سری ب)
PDA	a ۴/۳۴	a ۳/۸۱	b ۰/۲۶	b ۰/۸۰	a ۳/۲۳	a ۴/۰۸	a ۴/۱۳
CEA	c ۰/۶۶	b ۲/۹۱	a ۰/۵۵	a ۱/۲۳	a ۳/۰۴	a ۳/۹۵	a ۴/۱۰
MGA	a ۴/۰۴	a ۳/۷۹	b ۰/۲۱	b ۰/۸۸	a ۳/۲۳	a ۴/۱۰	a ۳/۴۳
YPG	b ۱/۹۵	c ۱/۹۴	b ۰/۲۴	c ۰/۱۷	b ۱/۳۷	b ۱/۶۲	b ۱/۰۷
محیط کشت	*Cyclocybe sp* (سری ب)	*Daedale opsis sp* (سری ب)	*Ganoderma sp* (سری ب)	*Leucoagaricus sp.* (سری ب)	*Trametes sp* (سری ب)	*Armillaria sp* (سری ب)	*Hydnopoly porus fimbriatus* (سری ج)
PDA	b ۲/۹۴	a ۳/۲۳	a ۲/۹۳	b ۱/۱۷	b ۳/۶۳	ab ۰/۴۴	a ۵/۵۱
CEA	a ۳/۲۹	b ۲/۰۲	a ۲/۸۴	a ۲/۰۸	b ۳/۵۱	a ۰/۵۲	a ۵/۴۳
MGA	c ۲/۷۵	a ۳/۲۵	a ۲/۵۲	b ۱/۰۴	a ۴/۲۵	b ۰/۴۰	a ۵/۵۶
YPG	d ۱/۶۳	c ۰/۹۲	b ۰/۱۳	c ۰/۴۴	c ۰/۸۹	c ۰/۱۲	b ۳/۳۸
محیط کشت	*Trametes gibbosa* (سری ج)	*Pestaloti opsis versicolor* (سری ج)	*Psathyrella candolleana* (سری ج)	*Pestalotiopsis versicolor* (سری ج)	*Trametes gibbosa* (سری ج)	*Coprinellus disseminatus* (سری ج)	*Paraconiothyrium brasiliense* (سری ج)
PDA	b ۳/۴۸	a ۳/۲۸	b ۲/۲۳	a ۴/۱۷	a ۴/۷۳	a ۳/۴۲	b ۲/۳۲
CEA	b ۳/۴۸	a ۳/۳۱	a ۳/۴۵	a ۳/۲۳	ab ۳/۲۲	a ۵/۶۶	a ۳/۴۲
MGA	a ۵/۵۱	a ۳/۳۳	b ۲/۴۲	a ۳/۲۵	a ۴/۶۹	b ۳/۳۰	b ۲/۳۱
YPG	c ۱/۷۳	b ۲/۲۵	c ۱/۹۲	b ۱/۵۱	b ۱/۵۳	c ۲/۳۱	c ۱/۴۵
محیط کشت	*Trametes versicolor* (سری ج)	*Xylariaceae sp.* (سری ج)	*hypholoma sp.* (سری ج)	*Neopestaliopsis sp.* (سری ج)	*darabkola 21* (سری د)	*ganoderma sp.* (سری د)	*Trametes hirsuta* (سری د)
PDA	b ۳/۲۳	b ۱/۲۴	b ۰/۶۴	a ۴/۷۶	bc ۳/۱۱	a ۴/۲۵	a ۴/۶۴
CEA	b ۳/۲۹	a ۲/۰۰	a ۱/۶۹	b ۲/۵۷	ab ۳/۷۷	c ۳/۵۹	a ۴/۸۰
MGA	a ۵/۵۷	b ۱/۲۹	b ۰/۸۹	a ۴/۶۳	ab ۴/۱۸	b ۴/۱۴	a ۴/۵
YPG	c ۱/۰۵	c ۰/۶۱	c ۰/۰۰	b ۱/۸۴	c ۲/۳۷	d ۱/۸۵	b ۱/۸۵
محیط کشت	*ganoderma sp.* (سری د)	*Stereum hirsutum* (سری د)	*Xylariaceae sp.* (سری د)	*darabkola 11* (سری د)	*Trametes gibbosa* (سری د)	*Irpex lacteus* (سری د)	*ganoderma sp.* (سری د)
PDA	a ۴/۳۰	a ۴/۸۲	b ۲/۰۳	a ۸/۵۵	a ۴/۷۷	a ۸/۳۷	a ۴/۷۷
CEA	a ۳/۹۱	b ۲/۷۷	b ۲/۲۰	a ۷/۱۴	a ۴/۷۶	a ۸/۲۰	c ۳/۱۳
MGA	a ۴/۵۷	a ۴/۸۸	a ۲/۸۰	a ۸/۴۱	a ۴/۷۹	b ۵/۶۷	b ۴/۵۰
YPG	b ۲/۳۷	c ۲/۲۰	c ۱/۵۵	b ۲/۴۰	b ۱/۶۳	b ۴/۳۰	d ۱/۵۱

Archive of SID

www.SID.ir

محیط کشت	*gps 057* (سری د)	*gps 12* (سری د)	*gps 047* (سری د)	164 (سری ه)	184 (سری ه)	208 (سری ه)	*hypholoma sp.* (سری ه)
PDA	b ۲/۴۵	a ۴/۹۳	b ۲/۱۶	a ۶/۶۷	a ۴/۳۰	b ۱/۰۹	c ۰/۶۴
CEA	c ۱/۵۵	a ۵/۶۲	ab ۲/۸۹	b ۴/۹۰	c ۳/۴۵	c ۰/۶۷	a ۱/۸۱
MGA	a ۳/۶۶	a ۴/۶۵	a ۴/۰۵	a ۶/۵۳	b ۳/۹۴	a ۱/۷۵	b ۰/۹۵
YPG	d ۰/۴۶	b ۲/۳۸	b ۱/۶۶	c ۴/۴۸	d ۲/۷۰	c ۰/۵۶	d ۰/۰۰

محیط کشت	*Trametes sp.* (سری ه)	۱۲۸ (سری ه)	۱۷۲ (سری ه)	*Trametes sp.* (سری ه)	167 (سری ه)	*trametes versicolor* (سری ه)
PDA	b ۵/۰۲	a ۴/۸۳	a ۳/۰۵	b ۵/۱۳	a ۶/۹۴	a ۵/۰۷
CEA	b ۴/۹۱	a ۴/۷۱	a ۳/۰۳	c ۴/۶۰	a ۶/۶۷	b ۳/۸۶
MGA	a ۵/۵۷	a ۴/۷۰	a ۳/۰۰	a ۶/۸۱	b ۵/۰۲	a ۴/۹۵
YPG	c ۰/۸۹	b ۱/۷۱	b ۰/۶۵	d ۵/۰۶	b ۵/۱۸	c ۲/۸۷

Archive of SID

www.SID.ir

۴-۵- بررسی امکان تولید اندام باردهی

پس از گذراندن ۱۸ روز در مرحله تکمیل فاز رویشی میسلیوم در بستر کشت و ۱۰ روز القا فاز زایشی در یخچال، کیسه‌های مورد آزمایش به پایلوت تحقیقاتی برای بررسی امکان تولید اندام باردهی منتقل شدند. بطور کلی، مشاهدات نشان دادند که بسترهایی که جهت القا بهتر به یخچال منتقل شدند، اندام باردهی تشکیل دادند اما بسترهایی که این دوره را طی نکرده بودند هیچ گونه اندام باردهی تولید نکردند. از مجموع ۵۷ جدایه‌ای که برای بررسی امکان تولید قارچ مورد استفاده قرار گرفتند، جدایه‌های ۷ جنس مختلف موفق به تولید قارچ شدند که عبارت بودند از: *Pholiota aurivella*، *Lenzites tricolor*، *Ganoderma tsugae*، *Cyclocybe sp.*، *Trametes sp.*، *Deadaleopsis sp.*، *Donkia pulcherrima* (شکل ۴-۲۵) . مشاهدات نشان داد، قارچ‌های *Pholiota aurivella* و *Lenzites tricolor* پس از حدود ۵۰ روز (از انتقال به پایلوت میوه‌دهی فاز زایشی) اولین نشانه‌های تولید اندام زایشی قارچ را نشان دادند. اندام زایشی قارچ *Pholiota aurivella* به صورت ظهور کلاهک‌های نارنجی‌رنگ به‌صورت دسته‌ای در کنار هم نمایان شد. اندام زایشی قارچ *Lenzites tricolor* به صورت چند میوه جدا از هم روی بستر بود. قارچ‌های *Cyclocybe sp* و *Trametes sp.* پس از ۲۸ روز انتقال به پایلوت میوه‌دهی، اجسام ته سنجاقی نشان دادند که *Trametes sp.* تا بلوغ اندام باردهی ۲۵-۳۰ روز طول کشید. قارچ *Cyclocybe sp* دارای کلاهک‌هایی شبیه قارچ دکمه‌ای بود که پس از یک هفته از ظهور اجسام ته سنجاقی، نمایان شدند و حدود سه ۳ روز نیز دوام داشتند. این در حالی بود که قارچ دم بوقلمون *Trametes sp.* دارای دوره نمو میوه بسیار طولانی از مرحله ته سنجاقی تا تشکیل میوه کامل بود اما نمو این قارچ پس از نمایان

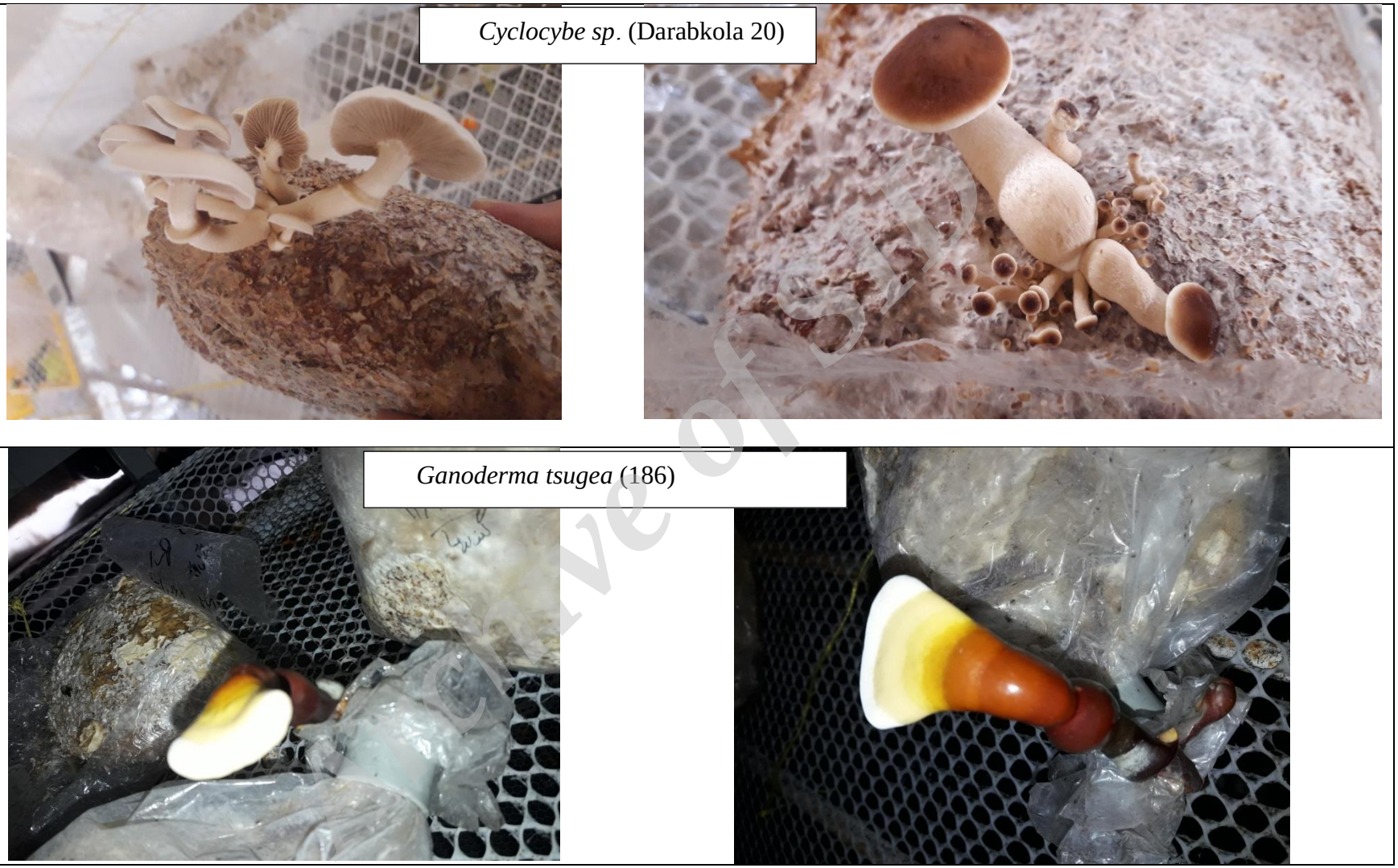
Archive of SID

www.SID.ir

شدن اندام باردهی ادامه داشت بطوریکه در طی ۲۵ روز، اندام‌های باردهی تغییر رنگ زیبایی از کرمی روشن به رنگ قهوه‌ای نارنجی و به شکل دم بوقلمون نشان دادند. قارچ *Ganoderma tsugae* پس از طی ۱۷ روز تکمیل فاز رویشی درون بستر، بیش از سه ماه زمان برد تا اولین نشانه‌های ته سنجاقی آشکار شد که بیش از ۳۵ روز نمو اندام باردهی ادامه داشت. این قارچ در طی نمو، دارای تغییر رنگ لبه کلاهک از رنگ سفید به رنگ زرد و قهوه ای بصورت سه رنگ بر روی میوه مشهود بود. قارچ *Daedaleopsis sp.* پس از طی ۱۷ روز زمان تکمیل رشد رویشی درون بستر در انکوباتور، و گذراندن ۴۲ روز در فاز زایشی، اولین نشانه‌های مرحله ته سنجاقی را به همراه تغییر رنگ قهوه‌ای آجری بستر کشت نشان داد. نمو اندام باردهی این قارچ تا ۳۵ روز ادامه داشت.

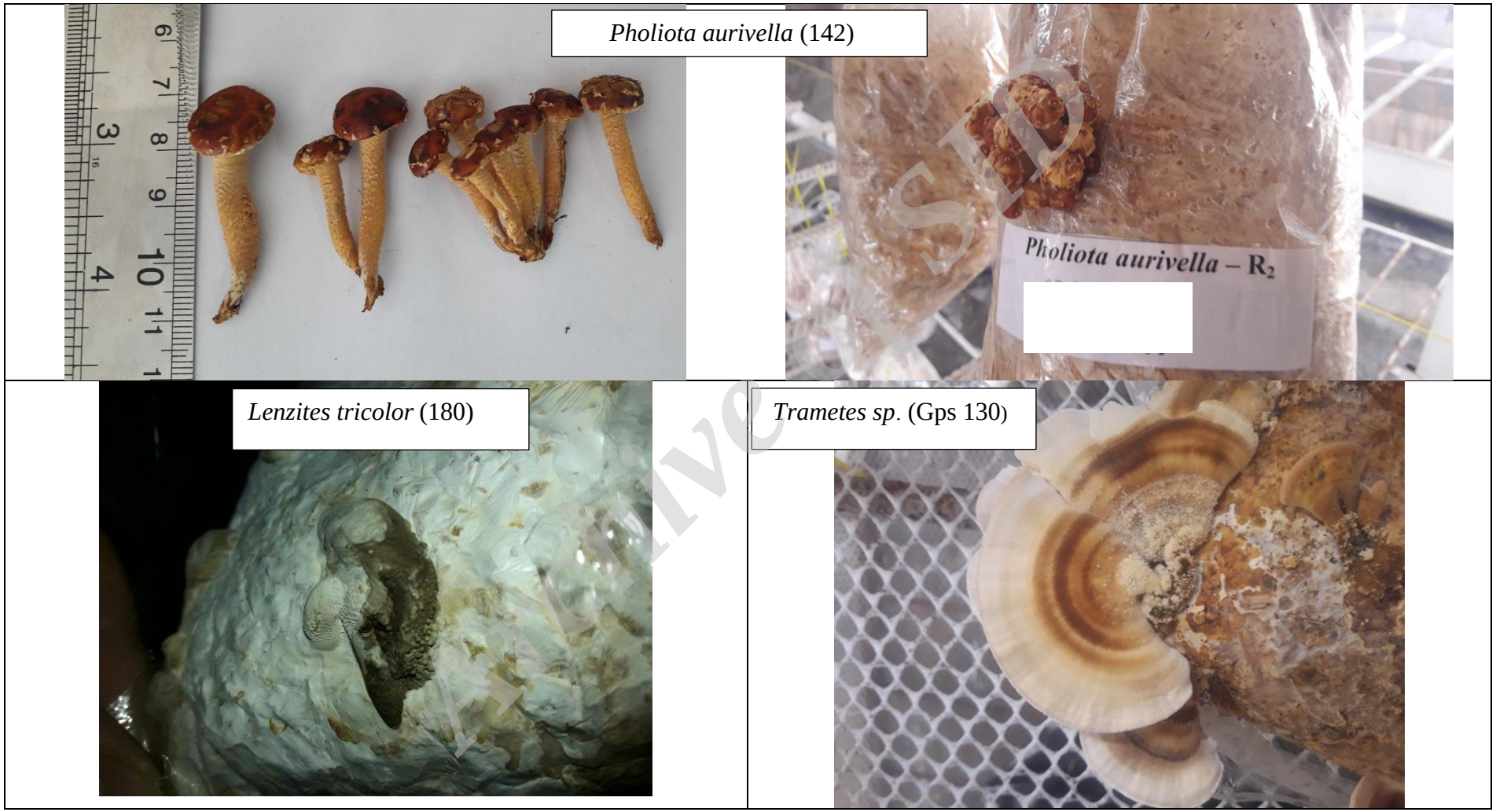
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴-۲۵- تولید اندام باردهی برخی از جدایه‌های قارچ‌های بومی در بستر کشت

Archive of SID
www.SID.ir

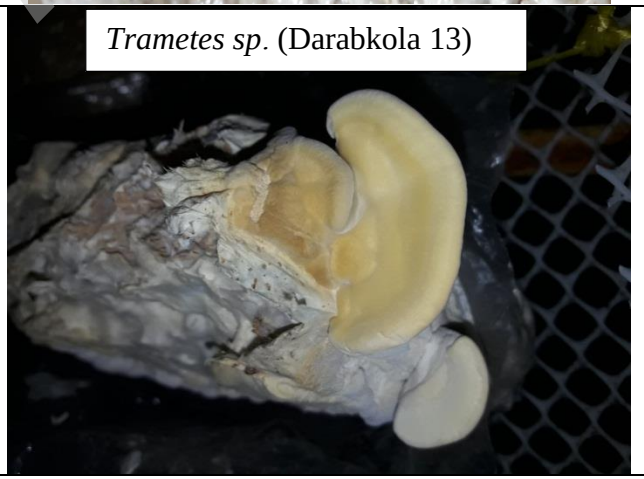


ادامه شکل ۴-۲۵- تولید اندام باردهی برخی از جدایه‌های قارچ‌های بومی در بستر کشت

www.SID.ir

Daedaleopsis sp. (Royan 8)

Donkia pulcherrima (Neka 24-D)



Trametes sp. (Darabkola 13)

ادامه شکل ۴-۲۵- تولید اندام باردهی برخی از جدایه‌های قارچ‌های بومی در بستر کشت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴-۱۸- نتایج زراعی‌سازی ۵۷ جدایه بومی قارچ کلاهک‌دار استان مازندران

ردیف	کد اولیه (هنگام جمع آوری)	جنس/گونه قارچ (پس از تایید مولکولی یا مورفولوژیکی)	شاخه	مرحله زراعی سازی (اهلی سازی)		
				کشت زنده میسلیوم	اسپاون	اندام باردهی
۱	101	*Macrolepiota konradii*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۲	186	*Ganoderma tsugae*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۳	158	*Lycoperdon pyriforme*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴	Neka 24-D	*Donkia pulcherrima*	بازیدیومایکوتا	✓	×	✓
۵	196	*Hohenbuehelia auriscalpium*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۶	131	*Fomes fomentarius*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۷	180	*Lenzites tricolor*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۸	142	*Pholiota aurivella*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۹	176	*Hypholoma fasciculare*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۰	GPS 130	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۱۱	Royan 8	*Daedaleopsis sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۱۲	Neka 25-2	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۳	GPS 179	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۴	GPS 30	*Marasmiellus sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۵	Darabkola 13	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۱۶	Royan 1	*Leucoagaricus sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۷	GPS 173	*Armillaria sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۸	Neka 25-1	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۱۹	Darabkola 20	*Cyclocybe sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	✓
۲۰	GPS 177	*Hypholoma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۲۱	Royan 6	*Paraconiothyrium brasiliense*	آسکومایکوتا	✓	✓	×
۲۲	Darabkola 8	*Xylariaceae sp.*	آسکومایکوتا	✓	✓	×
۲۳	GPS 029	*Hydnopolyporus fimbriatus*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۲۴	NUR 8	*Trametes gibbosa*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۲۵	NUR 9	*Coprinellus disseminatus*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×

Archive of SID

www.SID.ir

ادامه جدول ۴- ۱۸-

ردیف	کد اولیه (هنگام جمع آوری)	گونه قارچ (پس از تایید مورفولوژیکی و مولکولی)	شاخه	مرحله زراعی سازی (اهلی سازی)		
				کشت زنده میسلیوم	اسپاون	اندام باردهی
۲۶	NUR 2	*Pestalotiopsis versicolor*	آسکومایکوتا	✓	×	×
۲۷	GPS 007	*Trametes versicolor*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۲۸	NUR 10	*Psathyrella candolleana*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۲۹	GPS 022	*Trametes gibbosa*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۳۰	GPS 016	*Pestalotiopsis versicolor*	آسکومایکوتا	✓	✓	×
۳۱	Neka 29-1	*Neopestalotiopsis sp.*	آسکومایکوتا	✓	✓	×
۳۲	GPS 002	*Xylariaceae sp.*	آسکومایکوتا	✓	×	×
۳۳	GPS 005	*Irpex lacteus*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۳۴	GPS 12	در دست شناسایی	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۳۵	GPS 017	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۳۶	GPS 037	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۳۷	GPS 038	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۳۸	GPS 042	*Trametes hirsuta*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۳۹	GPS 047	در دست شناسایی	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۰	GPS 052	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	×	×
۴۱	GPS 057	در دست شناسایی	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۲	GPS 063	*Trametes gibbosa*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۳	Darabkola 1	*Stereum hirsutum*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۴	Darabkola 11	در دست شناسایی	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۵	Darabkola 21	شناسایی مورفولوژیکی *fomes*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۶	Bozchaft 2	*Ganoderma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۷	197	*Pochonia chlamydosporia*	آسکومایکوتا	✓	✓	×
۴۸	146	*Irpex sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۴۹	184	شناسایی مورفولوژیکی *pleurotus*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۰	208	در دست شناسایی	بازیدیومایکوتا	✓	×	×

Archive of SID
www.SID.ir

۵۱	106	*Hypholoma sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۲	119	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۳	128	شناسایی مورفولوژیکی *Trametes*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۴	172	شناسایی مورفولوژیکی *Ganoderma lucidium*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۵	122	*Trametes sp.*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۶	107	*Trametes versicolor*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×
۵۷	167	مورفولوژیکی *Trametes*	بازیدیومایکوتا	✓	✓	×

Archive of SID

www.SID.ir

فصل پنجم: تجزیه و تحلیل یافته‌های تحقیق

یافته‌های این پژوهش نشان داد که مجموعا ۹۱ جدایه در کشت بافت اولیه در محل جمع آوری موفق بودند (تولید میسلیوم زنده کردند) که برای کلید مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گرفتند و در نهایت ۶۲ جدایه تایید مورفولوژیکی شدند. سپس از میان این ۶۲ جدایه، ۵۲ جدایه به طور موفقیت آمیزی از طریق آنالیز مولکولی (مبتنی بر ITS) تایید جنس یا گونه شدند. این ۵۲ جدایه مشتمل بر ۲۹ جنس متفاوت و ۲۱ گونه متفاوت بوده که ۴۳ عدد از آنها متعلق به شاخه بازیدیومایکوتا (اصطلاحا بازیدیومایست که دارای ارزش بیشتری هستند) و ۹ عدد از آنها متعلق به شاخه آسکومایکوتا (اصطلاحا آسکومایست که قابلیت اهلی سازی و تولید اندام میوه‌دهی ندارند) بودند. همزمان با آنالیز ITS، خالص سازی میسلیوم و زراعی سازی (اهلی سازی) ۵۷ جدایه بومی انجام شد. در بین محیط‌کشت‌های جامد مورد استفاده برای خالص‌سازی میسلیوم، دو محیط کشت PDA و MGA بهترین شرایط رشدی را داشتند. با توجه به شاخص‌های کیفی رشد میسیلیوم جدایه‌های قارچ بومی، محیط کشت YPG، محیط رشدی مناسبی برای هیچ کدام از جدایه‌ها نبود. در بین جدایه‌های مورد بررسی، قارچ *Pochonia chlamydosporia* ، *Hypholoma sp* ، *Ganoderma sp.(Gps 017)*، *Ganoderma sp.*، *Hypholoma sp.*، 208، *Armillaria sp.*، *Lycopedron pyriform*، *Macrolepiota kornadii* و *Hohenbohelia Auriscapium* در هر چهار محیط کشت مورد استفاده در آزمایش سرعت رشد کند یا خیلی کند داشتند. سایر جدایه‌ها رشد مطلوبی نشان دادند. همچنین برخی از جدایه‌ها نظیر *Armillaria sp.* در محیط کشت جامد تولید ریزومورف نمودند که با کلید مورفولوژیکی آنها مطابقت داشت. ریزومورف‌ها به نام طناب‌های میسلیومی[1] نیز شناخته می‌شوند که در واقع تجمعی از هیف‌ها می‌باشند. کشت مایع (کشت تعلیقی) میسلیوم برای تولید میسلیوم انبوه با

[1] Mycelial cords

Archive of SID

www.SID.ir

هدف جایگزینی برای اندام باردهی قارچ انجام شد، به خصوص برای جدایه‌های بومی که قاعدتا به سختی اندام باردهی تولید می‌کنند. قارچ *Neopestalotiopsis sp.* با بیشترین توده میسلیومی بهترین رشد و دو قارچ *Cyclocybe sp.* و *Hypholoma sp.* با کمترین توده میسلیومی ضعیف‌ترین رشد را نشان دادند. سایر جدایه‌ها رشد مطلوبی در محیط کشت مایع نشان داده و توده میسلیومی مطلوبی تولید نمودند. اسپاون با هدف تولید بذر قارچ و سهولت انتقال به بستر کشت و انتقال به آزمایشگاه یا مراکز تحقیقاتی دیگر انجام شد. با توجه به وضعیت رشد رویشی میسلیوم جدایه‌های قارچ در اسپاون، مشخص گردید که اسپاون دانه‌های گندم در گونه‌های *Lenzites tricolor*، *Ganoderma tsugae* و *Fomes fomentarius*، *Pholiota aurivella*، *Macrolepoita konradii*، *Hypholma fasciculare* و *Lycopedron pyriforme*، *Marasmiellus sp*، *Trametes sp*، *Cyclocybe sp.*، *Daedaleopsis sp*، *Ganoderma sp*، ۱۸۴*Armillaria sp.*، *Leucoagaricus sp.*، ۱۲۸ ، *Pochonia chlamydosporia*، ۱۶۷، *Irpex sp.*، ۱۷۲ و Trametes sp.، *Trametes sp.* ، *Trametes versicolor*، *Hypholoma sp.* و *Coprinellus disseminatus*، *Psathyrella candolleana* و *Trametes versicolor*، *Pestalotiopsis versicolor*، *Paraconiothyrium brasiliense* و *Trametes gibbosa*، *Neopestalotiopsis sp.* و *Hypholoma sp* ، *Darabkola11*، *Darabkola 21*، *Ganoderma sp.* ، *Trametes gibbosa*، *GPS057*، *Gps 047*، *Trametes hirsuta*، *Ganoderma sp.* ، *Irpex lacteus* و *Xylariaceae sp.* رشد مناسبی را نشان داد. اما برای جدایه‌های *Donika pulcherima* و *Hohenbuehelia auriscapium*، *Hydnopolyporus fimbriatus*، *Pestalotiopsis versicolor*، *Xylariaceae sp*، ۲۰۸، *Ganoderma sp.*، *Ganoderma* *sp.(Gps 017)*، *Ganoderma sp.*، *Stereum hirsutum* هیچگونه رشدی مشاهده نشد.

Archive of SID

www.SID.ir

با توجه به عدم رشد میسلیوم برخی از جدایه‌ها در اسپاون، این جدایه‌ها مستقیما از محیط کشت جامد به بستر کشت خاک اره منتقل شدند. سایر جدایه‌ها، از طریق اسپاون و مایه‌زنی به بستر کشت منتقل شدند. در بستر کشت، هدف بررسی امکان تولید اندام باردهی (میوه) قارچ در ۵۷ جدایه بومی تایید شده در این طرح بود. از مجموع ۵۷ جدایه تایید شده در این طرح، جدایه‌های مربوط به ۷ جنس مختلف بازیدیومایستی موفق به تولید اندام باردهی در کمپوست مصنوعی شدند. این بدان معنی است که قارچ وحشی از دل طبیعت مجددا در بستر کشت مصنوعی به شکلی قابل تکرار و پایدار باز تولید شده است (معادل اهلی سازی در گیاهان وحشی). تولید اندام باردهی قارچ بسیار مهم است چراکه یکی از مهمترین ابزارهای تحقیقاتی مورد نیاز برای بررسی اثرات بیولوژیکی قارچ‌های کلاهک‌دار، تولید اندام باردهی (میوه‌دهی) آنها در بستر کشت است. برای تهیه بستر کشت می‌توان از فرآورده‌های فرعی کشاورزی، نظیر کاه و کلش غلات، خاک‌اره، تراشه چوب و دیگر پس‌ماندهای سلولزی استفاده کرد.

در این طرح فقط جدایه‌های بازیدیومایست موفق به تولید اندام میوه‌دهی شدند که البته دور از انتظار نبود. از این میان ۵۲ جدایه تایید شده در این پژوهش، ۹ جدایه متعلق به آسکومایست (از ۷ جنس مختلف) و ۴۳ جدایه متعلق به بازیدیومایست (از ۲۹ جنس مختلف) می‌باشند. جنس‌های آسکومایست عبارتند از: *Pestalotiopsis sp.*، *Pestalotiopsis versicolore*، *Xylariaceae sp.*، *Paraconiothyrium brasiliense* و *Pocharia chlamydosporia*. بایستی توجه داشت که آسکومایست‌ها به دلیل همزیستی اجباری با گیاهان یا شرایط خاص منطقه‌ای محل جمع آوری، امکان تولید اندام باردهی در کمپوست مصنوعی را ندارند و لذا از این نظر خارج از محدوده این طرح هستند اما به هر حال تمامی آسکومایست‌هایی که توسط مرکز ملی ذخایر برای زراعی سازی ارسال شدند، مورد کشت خالص میسلیوم (جامد و مایع) و تولید اسپاون قرار گرفتند. در بسیاری از تحقیقات کاربردی بر روی آسکومایست‌ها، استفاده از میسلیوم خالص در محیط کشت جامد یا مایع امری مرسوم و متداول می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

این یک موضوع شناخته شده است که تهیه اندام باردهی قارچ‌های بومی در کمپوست مصنوعی با توجه به غیر زراعی بودن قارچ بومی (که رویش آن در طبیعت به فصل یا مکان خاصی بستگی دارد و راندمان تولید بسیار اندکی دارند) با چالش‌هایی همراه است. یکی از موثرترین راهکارها برای غلبه بر این چالش، استفاده از کشت تعلیقی میسلیوم (در محیط کشت مایع) است که اخیرا مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (Zied, 2017). کشت تعلیقی میسلیوم به لحاظ ژنتیکی با سلول‌های میسلیومی کلاهک و اندام باردهی یکسان است و لذا راهی جایگزین برای تولید توده زنده میسلیومی برای کاربرد در مطالعات اثرات بیولوژیکی قارچ‌های کلاهک‌دار است. بایستی توجه داشت که استفاده از سیستم‌های کشت تعلیقی در محیط کشت مایع برای تولید میسلیوم قارچ‌های تجاری (که به سهولت تولید اندام باردهی دارند) نیز سودمند است چراکه موجب تولید میسلیوم یکنواخت در زمان کوتاه بدون تفرق میوزی، بدون وابستگی به فرمولاسیون بستر کشت، دارای راندمان بالا برای تولید ترکیبات خاص مورد نظر و کنترل بهتر پارامترهای اثر گذار محیطی می‌شود (Zied, 2017; Lindequist et al., 2005). نتایج حاکی از کشت تعلیقی، موفقیت تمامی ۵۷ جدایه در تولید توده زنده میسلیومی بود. میسلیوم خالص تولید شده در کشت تعلیقی جایگزینی برای اندام باردهی این قارچ‌ها محسوب شده و این توده میسلیومی پس از خشک کردن (در خلاء به صورت لیوفیلیزه) در فریزر منهای ۲۰ نگهداری شده است که برای طرح‌های آتی بر روی خواص بیولوژیکی این جدایه‌ها مورد استفاده قرار خواهد گرفت. در مطالعات بعدی با افزایش ابعاد تولید کشت تعلیقی، می‌توان مقادیر بیشتری توده زنده میسلیومی بدست آورد.

تجربه بیش از دو دهه تحقیق روی قارچ‌ها در عرصه‌های جنگلی ایران نشان داده که بسیاری از آنها می‌توانند نقش مؤثری در اقتصاد، محیط زیست، بهداشت و درمان، معیشت و زندگی روزمره ما داشته باشند. از طرفی جنگل‌های کشورمان به ویژه جنگل‌های استان‌های شمال و شمال غرب کشور، به دلیل

Archive of SID

www.SID.ir

داشتن اقلیمی معتدل، پوشش گیاهی مناسب و رطوبت کافی، از طیف گسترده‌ای از گونه‌های قارچ‌های جنگلی برخوردار هستند که این موضوع می‌تواند به عنوان سرمایه‌ای برای کشورمان مطرح باشد. انواع مختلفی از قارچ‌های خوراکی، دارویی، صنعتی و گونه‌های همزیست با گیاهان، ظرفیت استفاده‌های کاربردی فراوانی را می‌توانند داشته باشند. حتی قارچ‌های سمی و گونه‌های قارچی روانگردان در مطالعات پزشکی بسیار اثرگذار خواهند بود (عارفی‌پور و همکاران، ۱۳۹۶). از اعصار قدیم، قارچ‌های کلاهک‌دار منابع مهمی برای کاربرد خوراکی و دارویی برای انسان‌ها بوده‌اند (Wasser., 2002). ترکیبات مختلف موجود در قارچ‌های کلاهک‌دار منجر به تقویت سیستم بدن انسان شده و ابتلا به بیماری‌ها را در بدن کاهش می‌دهد (Manzi et al., 1999). آنها حاوی محتوای بالایی از پروتئین، فیبر خام، اسیدهای چرب ضروری، عناصر معدنی رژیمی و انواع ویتامین‌ها می‌باشد. قارچ‌ها علاوه بر ارزش تغذیه‌ای نیز منبع غنی از مواد فعال زیستی هستند که نقش مهمی در سلامتی افراد ایفا می‌کنند. آنها طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه با ارزش بالینی بالا تولید می‌کنند. علاوه بر این موارد، برخی از قارچ‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدسرطان و اثرات تنظیم کننده ایمنی هم می‌باشند (Ferreira et al., 2007; Mau et al., 2004; Oyetayo et al., 2009; Barros et al., 2007). علاوه بر قارچ‌های زراعی-تجاری، ترکیبات رژیمی و با ارزش دارویی در قارچ‌های وحشی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (Lindequist et al., 2005). این یافته‌ها مجموعا حاکی از این واقعیت است که قارچ‌های کلاهک‌دار یک منبع غنی از ترکیبات رژیمی و دارویی است که قابلیت استفاده در پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف بدن و ممانعت از فعالیت ارگانیسم‌های بیماری‌زا را دارد (Mshandete., 2014). جنس‌هایی از قارچ‌های کلاهک‌دار که در پژوهش حاضر، جمع آوری، تایید و زراعی سازی (تولید اندام باردهی) شده‌اند در مطالعات سایر محققین نیز از نظر خواص رژیمی و دارویی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. پژوهش‌هایی که بر روی جنس‌های *Lenzites*، *Ganoderma* و *Trametes* صورت گرفته است، مشخص کرده است که این جنس‌ها دارای خواص ضد

Archive of SID

www.SID.ir

میکروبی (ضد باکتریایی و ضد قارچی) و ضد سرطانی بوده و بنابراین در تحقیقات زیست-پزشکی اهمیت فراوانی دارند (Vamanu and Voica., 2017; Yamac and Bilgili., 2006). تحقیقات اخیر نشان داده است که گونه‌های متفاوت از جنس *Ganoderma* خاصیت دارویی داشته و در پیشگیری یا درمان بسیاری از بیماری‌ها نقش دارند. پلی‌ساکارید و استرول‌های موجود در گونه *Ganoderma applanatum* اثرات مفیدی در درمان بیماری‌هایی همچون برونشیت، هپاتیت، فشارخون بالا، انواع تومورها و اختلالات ایمنی دارد (Kosanic., 2013). در پژوهشی که توسط Mashandete و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد، مشخص گردید که ترکیبات استخراج شده از میوه‌ی قارچ *Ganoderma tsugea* حاوی مقدار بالایی فنولیک اسید، بتا کاروتن، لیکوپن و ویتامین c می‌باشد. علاوه بر این قابلیت بالایی در تخریب رادیکالهای آزاد نشان داد. در مجموع مشخص شد که این قارچ خاصیت دارویی و درمانی قابل توجهی دارد.

با توجه به تحقیقات صورت گرفته مشخص شده است که گونه‌های متعلق به جنس *Trametes* (دم بوقلمون) نیز خواص دارویی و درمانی قابل توجهی دارد (Kamiyama et al., 2013). با مراجعه به وب سایت رسمی آزمایشات بالینی FDA آمریکا (https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00680667) مشخص می‌شود که این قارچ در حقیقت تنها قارچی است که مجوز انجام آزمایشات بالینی FDA آمریکا برای استفاده به عنوان کمک درمان سرطان پیشرفته پستان و پروستات را دریافت کرده است. مواد فنولیک و غیر فنولیک موجود در این قارچ دارای خاصیت قوی آنتی‌اکسیدانی است (Mohd Nor Rasid., 2010). ترکیبات استخراج شده از قارچ *Trametes versicolor* خاصیت محافظتی در برابر اکسیداسیون گلبول قرمز دارد. این نتایج نشان دهنده این است که ترکیبات پلی ساکاریدی خارج و داخلی سلولی در این قارچ حاوی مواد بیولوژیکی مهم با پتانسیل دارویی و درمانی است (Santos Arteiro., 2012; Sun., 2014). علاوه بر این پروتئین‌های موجود در این پلی‌ساکاریدها (Jhan et al., 2016) دارای خاصیت ضد سرطانی

Archive of SID

www.SID.ir

بوده و سبب افزایش قدرت ایمنی بدن می‌شوند (Yang et al., 2009; Yeung., 2012). قارچ *Trametes hirsute* نیز دارای کاربری صنعتی می‌باشد (Vazirian., 2014).

جنس دیگر زراعی سازی شده در پژوهش حاضر *Deadaleopsis* است که متعلق به راسته Polyporales و خانواده *Polyloraceae* است. قارچ‌های این جنس به طور معمول به دلیل سخت و چوبی بودن، غیر خوراکی هستند؛ اما تعداد اندکی از گونه‌های آن خوراکی می‌باشند (Shino et al., 2005; Yu et al., 2008). در تحقیقی که توسط Vidovic و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، مشخص گردید که قارچ *Daedaleopsis confragosa* حاوی مقدار زیادی از ترکیبات فنلی است. طی آزمایشات انجام شده در این قارچ مشخص شد که عصاره آن دارای خاصیت قوی آنتی اکسیدانی است (Vidovic et al., 2011). با توجه به ترکیبات استخراج شده از قارچ *Daedaleopsis tricolor* مشخص گردید که این قارچ دارای خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی قوی و آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد (Zhao et al., 2013).

گونه‌ای از جنس *Pholiota* (که در تحقیق حاضر زراعی سازی شده است) با نام علمی *Pholiota adipose* غنی از ماده مخاطی است که حاوی پلی‌ساکاریدی است که قابلیت مهار بیماری سرطان و سارکوما-۱۸۰ تا ۸۰ الی ۹۰ درصد در موش‌ها را داشته است. علاوه بر این قابلیت ممانعت از آلودگی توسط *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli* و *Mycobacterium tuberculosis* را نیز دارا می-باشد (Dulger., 2004). این قارچ غنی از پروتئین، آمینواسیدهای ضروری، فیبر، عناصر، ویتامین‌ها، کربوهیدارت‌ها می‌باشد. پلی ساکاریدهای استخراج شده از اندام میوه این قارچ دارای خاصیت آنتی توموری، آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی می‌باشد (Deng et al., 2011). با توجه به تحقیقات انجام شده مشخص گردید که گونه *Pholiota aurivella* دارای آمینواسیدی به نام لکتین می باشد (Kawagishi et al.,

Archive of SID

www.SID.ir

2014). لکتین همانند فنولیک‌ها، پلی‌ساکاریدها و لنتینان‌ها جزء ترکیبات بیولوژیکی قرار می‌گیرد و ممکن است دارای خاصیت ضد میکروبی علیه پاتوژون‌ها داشته باشد (Abubakar et al., 2016).

جنس *Lenzites* که در تحقیق حاضر زراعی سازی شده است، به عنوان منبع غنی از ترکیبات آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی شناخته شده است (Oyetayo., 2009). بر طبق پژوهش Abubakar و همکاران (۲۰۱۶) مشخص شده که ترکیبات بیوزیستی موجود در قارچ *Lenzites quercina* دارای اثرات ضد میکروبی است. مواد فیتوشیمیایی موجود در این قارچ تاثیرات قابل توجهی بر علیه باکتری‌های استافیلوکوک (عامل بیماری پوستی) داشتند. این مواد می‌توانند مشکل مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در درمان این بیماری را حل کرده و در روند درمان استفاده شوند.

جنس *Cyclocybe sp.* (*Agrocybe sp.*) نیز در این تحقیق زراعی سازی شده و تولید میوه داشت. عصاره متانولی حاصل از میوه قارچ *Agrocybe aegerita* حاوی مقادیر متفاوتی از مواد مختلف با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا می‌باشد (Petrovic et al., 2015). در پژوهشی که توسط Chien و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد مشخص گردید که دو قارچ *Ganoderma tsugae* و *Agrocybe cylindracea* قادر هستند تعداد سلول‌های سرطانی را به طور قابل توجهی کاهش دهند. عصاره حاصل از میوه و میسلیوم گونه *Ganoderma tsugae* تاثیر کنترل‌کنندگی بیشتری نسبت به گونه قارچ *Agrocybe cylindracea* نشان داد.

Archive of SID

www.SID.ir

جمع‌بندی نهایی:

در این پژوهش، نزدیک به ۲۰۰ جدایه از قارچ‌های بومی استان مازندران جمع آوری شد که از میان آنها ۶۲ سویه متعلق به جنس‌های مختلف دارای ارزش بالقوه صنعتی و دارویی به ویژه *Ganoderma* و *Trametes* دارای شناسنامه مورفولوژیکی و موقعیت جغرافیایی ثبت شده و همچنین سازگار شده با محیط کشت جامد، اسپاون، کشت تعلیقی و بعضا بستر کشت لیگنوسلولزی هستند. ۵۲ سویه از این ۶۲ سویه از طریق آنالیز ITS شناسایی مولکولی شده و بقیه نیز در دست شناسایی مولکولی در تحقیقات آینده می‌باشد. تمامی این ۶۲ سویه، به صورت میسلیوم تازه زنده، میسلیوم خالص لیوفیلیزه، نمونه خشک و نقش اسپور موجود است. همچنین ۳ نمونه خشک (متعلق به ۲ گونه مجزا) از جنس آگاریکوس نیز در اختیار است. ۷ جدایه نیز توانستند به میوه‌دهی بر روی بستر کشت مبتنی بر تراشه چوب بروند. سویه‌های بدست آمده در این پژوهش پتانسیل بالایی برای تحقیقاتی آتی دارند، از جمله بررسی اثرات بیولوژیکی این جدایه‌ها شامل اثرات ضد سرطانی، ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، پروبیوتیک و بررسی مقاومت‌های احتمالی موجود در گونه‌های بومی از نظر مقاومت به تغییر دما، رطوبت و پاتوژن‌ها. در تحقیقات آتی می‌توان همچنین نقش دما، pH، وضعیت انحطاط نژادی در اثر تکثیر متوالی، به‌نژادی، بررسی اثر متقابل محیط کشت با نژادهای یک گونه مشخص و تعیین بهترین شرایط برای نگهداری طولانی مدت نژاد را مورد بررسی قرار داد. در تحقیقات آتی همچنین این فرصت فراهم خواهد بود تا فرمولاسیون‌های بهتر برای تولید اندام باردهی (به خصوص در مورد گونه‌هایی که در این تحقیق رشد متوسط یا کند داشته و عملکرد باردهی ضعیفی داشتند)، بررسی دقیق فرآیند تولید اندام باردهی گونه‌های با کاربرد صنعتی و دارویی، امکان کشت میسلیوم در فرمانتور برای تولید انبوه میسلیوم برای کاربردهای صنعتی و دارویی و امکان استفاده از این جدایه‌ها در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی مورد ارزیابی قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع و مآخذ

فهرست منابع انگلیسی بر اساس سیستم APA (American Psychology Assosiation) و به ترتیب حروف الفبای نویسندگان مرتب شده است.

۱. آصف، م. ر. (۱۳۸۶).جمع آوری فلور قارچ های ماکروسکوپی ارسباران (زیرجنس*Myxacium* از جنس *Cortinarius*). رستنیها. ۸ (۲)، ۱۷۸-۱۸۵.

۲. آصف، م.ر. (۱۳۸۷). جمع آوری فلور قارچ های ماکروسکوپی ارسباران (قارچ های بولت از تیره Boletaceae و Suillaceae). رستنیها. ۹ (۲)، ۲۲۹-۲۱۰.

۳. آصف، م.ر. (۱۳۸۷). *Hydnellum peckii*، گونه جدید اکتومیکوریز برای فلور قارچ های ایران . رستنیها. ۹ (۲)، ۲۵۵-۲۵۴.

۴. آصف، م.ر. (۱۳۸۸). جمع آوری فلور قارچ های ماکروسکوپی ارسباران (*Phlegmacium* از جنس *Cartinarius*). رستنیها. ۱۰ (۱)، ۱۸۶-۱۷۸.

۵. آصف، م.ر. (۱۳۹۰). جمع آوری فلور قارچ های ماکروسکوپی ارسباران (تیره Russulaceae). رستنیها. ۱۲(۱)، ۳۸-۳۱.

۶. آصف شایان، م.ر. (۱۳۹۴). قارچ‌های دارویی ایران. انتشارات ایران‌شناسی. ۱۶۰ص.

۷. آقاجانی، ح.، جهانی، ع.، آصف، م.ر.، شیروانی، ا.، و آذریان، م. (۱۳۹۲). بررسی فاکتورهای مؤثر رویشگاهی بر فراوانی قارچ‌های ماکروسکوپی خاک‌زی و تحلیل حساسیت با استفاده از شبکه‌های عصبی مصنوعی (مطالعه موردی جنگل خیرود نوشهر). تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. ۴(۲۱)، ۶۲۸-۶۱۷.

Archive of SID
www.SID.ir

۸. ابراهیمی فر، ف. (۱۳۹۳). تعیین گونه قارچ‌های خوراکی وحشی با استفاده از نواحی **ITS** و بررسی تنوع ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگر **ISSR**. پایان نامه کارشناسی ارشد.دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی.

۹. بهرام، م. (۱۳۸۵). "بررسی فلور قارچ های ماکروسکوپی مناطق منتخب استان مازندران". پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.

۱۰. بهرام، م.و. آصف، م. و رایدل، ا.، (۱۳۸۷). بررسی فلور قارچی *Gomphales des Ramaria*،گونه جدیدی از راستهGomphales . رستنیها. ۹ (۱) ۱۲۸-۱۲۷.

۱۱. جعفری، ع. (۱۳۷۹). گیتاشناسی ایران، دایره المعارف جغرافیایی ایران، دانستنی‌های ایران.- انتشارات گیتاشناسی.

۱۲. حسینی، ز.، اسماعیلی، ا.، بازگیر، ع.، درویش نیا، م و محمودی، غ.ع. (۱۳۸۸). شناسایی برخی گونه‌های قارچ های ماکروسکوپی دارویی و سمی شهرستان خرم‌آباد فصلنامه علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان. ۱۱(۵)، ۸۳-۷۵.

۱۳. حیدریان، م.س و حاتمیان زارمی، ا. (۱۳۹۵). شناسایی مولکولی *Ganoderma lucidum* در ایران. رستنیها. ۱۷(۲) ۱۹۲-۱۸۸.

۱۴. ذکایی، م. و موسی زاده، ع. (۱۳۸۳).طرحی تحقیقی به منظور شناسایی قارچ های آسکومیست (کیسه‌ای) جمع آوری شده از جنگل های مازندران. زیست شناسی ایران. ۱۷ (۱)، ۶۹-۵۹.

۱۵. ذکایی، م. و گرانیان، ف. (۱۳۸۷). معرفی آسکومیست های ماکروسکوپی جنگل های شمال ایران (جنگل شهید زارع و سیاه رودبار). علوم دانشگاه تربیت معلم. ۸ (۴)، ۳۰۲-۲۹۵.

۱۶. عارفی‌پور، م.ر.، زمانی، س.م.، زینالی، س.، گرجی‌پور، ا. (۱۳۹۶). استفاده کاربردی از قارچ‌های جنگلی. طبیعت ایران. ۲(۵): ۵۰-۴۲.

Archive of SID
www.SID.ir

۱۷. عبیاوی، ن.، مروی مهاجر، م.ر.، اعتماد، و. و آصف، م.ر. (۱۳۹۵). ارتباط بین فراوانی قارچ‌های ماکروسکوپی چوبزی درختان راش (*Lipsky orientalis* Fagus) با عوامل فیزیوگرافی (مطالعه موردی: جنگل خیرود نوشهر). حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران. ۲(۱۴)، ۸۵-۷۷.

۱۸. عسگری، ب. و زارع، ر. (۱۳۹۴). معرفی هرباریوم وزارت جهاد کشاورزی ایران. رستنیها ۶ (ضمیمه ۱) ۳۵-۲۰.

۱۹. عزیزی، م.، پوریان فر، ح.ر. و عروجعلیان، ف. (۱۳۹۰). قارچ‌های دارویی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۲۰۰ ص.

۲۰. علی نژاد برمه، م. (۱۳۸۸). "معرفی و شناسایی قارچ های ماکروسکوپی دارویی استان مازندران". پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲۱. فارسی، م. و پوریان فر، ح.ر. (۱۳۹۰). پرورش و اصلاح قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (ویراست دوم با اصلاحات و اضافات). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد، ۲۷۵ ص.

۲۲. موسی زاده، ع.، برهانی، ع. و خورنکه، س. (۱۳۸۱). معرفی بزرگترین قارچ خوراکی [*Langerinannia gigintean* (batsch:pers.) rostk] با خاصیت دارویی در مراتع ییلاقی استان مازندران. تحقیقات مرتع و بیابان ایران. ۷ (۱).

22. Abubakar, Z., Ogidi, O.C and Oyetayo, V.O. (2016). Assessment of antistaphylococcal activity of ethanolic extract of Lenzites quercina (L) P. Karsten against clinical Staphylococcus species. *Clinical Phytoscience*. 2-8.

23. Asef, M.R and Tavanaie, G.H. (2004). Preliminary results of identification of macromycetes of Arasbaran. *Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress*. Tabriz University, Iran.

Archive of SID
www.SID.ir

24. Avin, F.A., Bhassu, S., Tan, Y.S., Shahbazi, P and Vikineswary, S. (2014). Molecular divergence and species delimitation of the cultivated oyster mushrooms: integration of IGS1 and ITS. *Sci World J,* Article ID 793414.

25. Barros, L.; Calhelha, R.C.; Vaz, J.A.; Ferreira, I.C.F.R.; Baptista, P and Estevinho, L.M. (2007). Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Euro. Food Res. Technol.*, 225:151-156.

26. Barroso, G., Ferandon, C and Callac, P. (2011). From the comparative analysis of fungal mitochondrial genes to the development of taxonomic and phylogenetic tools. In Mushroom biology and mushroom products. *Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, Arcachon, France, 4-7 October, Oral presentation*s. 1, 91-99. Institute National de la Recherche Agronomique (INRA).

27. Berns, K.I., Bond, E.C and Manning, F.J, eds. (1996). "The American Type Culture Collection". Resource Sharing in Biomedical Research. *Washington, D.C.: National Academies Press (US)*. Retrieved 14 May 2016.

28. Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3. 5.1 million species*?* Am. *J. Bot*, 98, 426-438.

29. Borhani, A., badalyan, S.M., Gharbyan, N.N and Mosazadeh, S.A. (2010). Biodiversity and Distribution of Macronfungi Associated with Beeech Forest of Northern Iran (Case Study Mazandaran Province). *World Application Science J*, 11(2), 151-158.

30. Buhse, F. (1860). Aufzählung der einer Reise durch Transkaukasien und Persien gesammelten Pflanzen (in Gemeinschaft mit Edmound Boissier). *Moskau, typ. Gautier*. 4. LXVII, LV, 248, 10 tab., 1 mappa geogr.

31. Chien, R.C., Tasi, S.Y., Lai, E.Y and Mau, J.L. (2015). Antiproliferative Activities of Hot Water Extracts from Culinary-Medicinal Mushrooms, *Ganoderma tsugae* and *Agrocybe cylindracea* (Higher Basidiomycetes) on Cancer Cells. *Int J Med Mushrooms*. 17(5): 453-462.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Das, S.K., Mandal, A., Datta, A.K., Gupta, S and Paul, R. (2013). Nucleotide sequencing and identification of some wild mushrooms. *Sci World J*, Article ID 403191, 7.

33. Deng, P., Zhang, G., Zhou, B., lin, R., Jia, L., Fan, K., Liu, X., Wang, G., Wang, L and Zhang, J. (2011). Extraction and in vitro antioxidant activity of intracellular polysaccharide by *Pholiota adiposa* SX-02. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111(1): 50-54.

34. Dentinger, B.T., Didukh, M.Y and Moncalvo, J.M. (2011). Comparing COI and ITS as DNA barcode markers for mushrooms and allies (Agaricomycotina). *PLoS One*, 6, 25081.

35. Dentinger, B.T.M., Gaya, E., Brien, H.O., Suz, L.M., Koch, R.A., Lachlan, R., Jorge R.D and Aime, M.C. (2015). Tales from the crypt: genome mining from fungarium specimens improves resolution of the mushroom tree of life. *Biological Journal of the Linnean Society*. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bij.12553/abstract.

36. Desjardin, D.E., Wood, M.G and Stevens, F.A. (2015). California Mushrooms: The Comprehensive Identification Guide. ISBN-13, 978-1604693539. http://www.mykoweb.com/.

37. Dulger, B. (2004). Antimicrobial activity of the macrofungus *Pholiota adipose*. *Fitoterapia*. 75: 395-397.

38. Erkel, E.I. (2009). The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma locium* (Fr.) Karst. *J Food Agric Environ*, 7, 841-844.

39. Ershad, J. (1995). Fungi of Iran (2nd ed.) *Agricultural Research, Education and Extension Organization, Publication* No.10, Tehran (1995) 874+14.

40. Evenson, V.S. (1997). Mushrooms of Colorado, Denver, Colorado. ISBN 1-56579-192-4 (Paperback).

Archive of SID

www.SID.ir

41. Evenson, V.S., Denver Botanic Garden. (2015). Mushrooms of the Rocky Mountain Region: Timber Press Field Guide.ISBN-13: 978-1604695762, ISBN-10: 1604695765.

42. Ferreira, ICFR., Baptista, P., Vilas-Boas, M and Barros, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 100: 1511-1516.

43. Gabel, A., Ebbert, E and Lovett, K. (2004). Macrofungi Collected from the Black Hills of South Dakota and Bear Lodge Mountains of Wyoming. *American Midland Naturalist*, 1, 43-62.

44. Gadwin, N. (2013). The UBC Herbarium: an institutional history. *University of British Columbia*. GEOG 429.

45. Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycol Res*, 95, 641-655.

46. Hawksworth, D.L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, 105(12),1422–1432.

47. Hobbs, C. (1995). Medical Mushrooms. An Exploration of Tradition, Healing and Culture. *Botanica Press*, Santa Cruz, CA.

48. Jhan, M.H., Yeh, C.H., Tsai, C.C., Kao, C.T., Chang, C.k and Hsieh, C.W. (2016). Enhancing the Antioxidant Ability of *Trametes versicolor* Polysaccharopeptides by an Enzymatic Hydrolysis Process. *Molecules*. 21.

49. Kamiyama, M., Horiuchi, M., Umano, K., Kondo, k., Otsuka, Y and Shibamoto, T. (2013). Antioxidant/anti-inflammatory activities and chemical composition of extracts from the mushroom *Trametes versicolor*. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*. 2(2): 85-91.

50. Karim, M., Kavosi, M.R., Mosazadeh, S.A and Borhani, A. (2012). Study on Diversity and Frequency of Macrofungi in Deciduous and Mix Forestation of

Archive of SID

www.SID.ir

Northern Iran (Case Study Golestan Province). *World Applied Sciences Journal*, 19 (9), 1268-1272.

51. Kawagishi, H., Abe, Y., Nagata, T., Kimura, A and Chiba, S. (1991). A Lectin from the Mushroom *Pholiota aurivella*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 55(10): 2485-2489.

52. Khaund, P and Joshi, S.R. (2014). DNA barcoding of wild edible mushrooms consumed by the ethnic tribes of India. *Gene*, 550, 123-130.

53. Kosanic, M., Rankovic, B and Dasic, M. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of mushrooms. *Bulgarian Journal of Agricultural Science.* 19(5): 1040-1046.

54. Kuo, M. (2006). Using a microscope: Viewing and measuring spores. *Retrieved from the Mushroom Expert.Com.* www.mushroomexpert.com/microscope_spores.html.

55. Kuo, M**.** (2005). The genus Armillaria: Honey mushrooms. *Retrieved from the MushroomExpert.Com* Web site: http://www.mushroomexpert.com/armillaria.html.

56. Lindequist U, Niedermeyer TNJ, Julich WD. (2005). The pharmacological potential of mushrooms. ECAM: 2(3):285–99.

57. Lindhe, A., Asenblad, N and Toresson, H. (2004). Cut logs and high stumps of spruce, birch, aspen and oak – nine years of saproxylic fungi succession. *Biological Conservation*, 119, 443–454.

58. Malekzadeh, K., Mohsenifard, E., Jalalzadeh, B and Farsi, M. (2014). Identification and strain-typing of button mushroom using ISSR, ITS, and IGS markers. *Mod Genet*, 9, 343-352.

59. Manzi, P and Pizzoferrato L. (1999). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chem*: 68: 315- 8.

Archive of SID

www.SID.ir

60. Masoumi, F., Pourianfar, H.R., Masoumi, A and Mostafavi, M.E. (2015). A study of mycelium characterization of several wild genotypes of the botton mushroom from iran. *Int. J.Adv. Res,* 3, 236-246.

61. Mau, J. L., Chang, C.N., Huang, S.J. and Chen, C.C. (2004). Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, Morchella esculenta and Termitomyces albuminosus mycelia. *Food Chemistry,* 87: 111-118.

62. Mohd Nor Rasid, N. (2010). Diversity And Antioxidant Activity Of *Trametes* Fr. In Malaysia. Faculty Of Science University Malaya Kuala Lumpur.

63. Mshandete, A.M. (2014). Cytotoxicity and Antioxidant Activities of *Ganoderma tsugae* - A Basidiomycetes Mushroom Indigenous from Tanzania. *International Journal of Life Sciences*. 3(4): 189-197.

64. Newbound, M., Mccarthy, M and Lebel, T. (2010). Fungi and the urban environment: A review. *Landscape and Urban Planning,* 96,138–145.

65. O'Brien B. L., Parrent J. L., Jackson J. A., Moncalvo J. M and Vilgalys R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of enviromental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5544–5550.

66. Oyetayo, V.O. (2009). Free Radical Scavenging And Antimicrobial Properties Of Extracts Of Wild Mushrooms. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 40: 380-386.

67. Oyetayo, V.O., Dong, C.H and Yao, Y.J. (2009). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Aqueous Extract from Dictyophora indusiata. *The Open Mycology Journal.* 3: 20-26.

68. Parra, L. (2008). *Agaricus L. Allopsalliota, Nauta & Bas, Fungi Europaei* (Vol. 1): Candusso Edizioni sas Alassio.

69. Petrovic, j., Glamoclija, J., Dejan, S., Ciric, A., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R and Sokovic, M. (2015). Nutritional value, chemical composition, antioxidant activity and

Archive of SID

www.SID.ir

enrichment of cream cheese with chestnut mushroom *Agrocybe aegerita* (Brig.) Sing. *J Food Sci Technol*. 52(10): 6711-6718.

70. Pushpa, H., Purushothama, K.B and Ramesh Thirumalesh, D.H. (2012). Taxonomic studies and molecular characterisation of *Tricholoma giganteum* and *Calocybe indica* isolates from Bangalore. *J Biochem Technol*, 3, S218-S220.

71. Saba, F., Papizadeh, M., Khansha, J., Sedghi, M., Rasooli, M., Amoozegar, M.A., Soudi, M.R and Fazeli, S.A.S. (2017). A Rapid and Reproducible Genomic DNA Extraction of Archaea, Bacteria, Cyanobacteria, Diatoms, Fungi, and Green Algae. *Journal of Medical Bacteriology*, 5(3-4), 22-28.

72. Santos Arteiro, J.M., Rosario Martins, M., Salvador, C., Fatima Candeias, M., Karmali, A and Teresa Caldeira, A. (2012). Protein–polysaccharides of *Trametes versicolor*: *production and biological activities*. 21: 937-943.

73. Schmit, J.P and Mueller, G.M. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv*, 16(1), 99–111.

74. Shiono Y., Tamesada Y., Muravayev Y.D., Murayama T and Ikeda M. (2005). N-Phenethylhexadecanamide from edible mushroom *Laetiporus Sulphareus*, *Nat. Prod. Res*. 4, 363-366.

75. Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V and Spouge, J.L. (2012) Fungal Barcoding Consortium. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA,* 109, 6241-6246.

76. Shafabakhsh, G.H., Fathi, F and Zayarzaeh, A. (2010). Improvement of road eventful points prioritization by artificial neural network. *Journal of Modeling in Engineering*, 8 (20), 71-81.

77. Shotbolt, R. 2015. MycoCam **4**, *from. http://www.shotbolt.com/uploads/MycoCam4_Setup.zip*

Archive of SID

www.SID.ir

78. Smith, D and Onions, A.H.S. (1994). The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Second edition. *IMI Technical Handbooks*. Wallingford, UK: Cab Int, 2,122.

79. Soto, M and Michelle. (2015). Inbioparque will keep its doors open (San Jose). 27 February. http://www.inbio.ac.cr.

80. Stamets, P and Chilton, J.S., (1983). *The mushroom cultivator: A practical guide to growing mushrooms at home*: Agarikon press..

81. Steiner, M., Linkov, I and Yoshida, S. (2002). The role of fungi in the transfer and cycling of radionuclides in forest ecosystems. *Journal of Environmental Radioactivity*, 58,217-241.

82. Sun, X., Sun, Y., Zhang, Q., Zhang, H., Yang, B., Wang, Z., Zhu,W., Li, B., Wang, Q and Kuang, H. (2014). Screening and comparison of antioxidant activities of polysaccharides from Coriolus versicolor. *Int. J. Biol. Macromol*. 69, 12–19.

83. Sunhee, l., Paul, E.J and Yeonhee, L. (2016). Publicly-funded biobanks and networks in East Asia. *Springer,. Journal of Environmental Radioactivity*, 58,217-241

84. Taylor, E. B. (2013). The Beaty Biodiversity Museum at UBC: An Experiment in Curation, Research, and Public Outreach. Proceedings of APRU Research Symposium on University Museums*: Forming a University Museum Collection Network as the Core of Frontier Research*, 65-68.

85. Torkelson, C.J., Sweet, E., Martzen, M.R., Sasagawa, M., Wenner, C.A., Gay, J., Putiri, A and Standish, L.J. (2012). Phase 1 clinical trial of *Trametes versicolor* in women with breast cancer. *ISRN oncology*, 2012.

86. Turkoglu, A. (2008). Macrofungal diversity of Babada (Denizli, Turkey). *African Journal of Biotechnology,* 7 (3), 192-200.

87. Vamanu, E and Alina, V. (2017). Total Phenolic Analysis, Antimicrobial And Antioxidant Activity Of Some Mushroom Tinctures From Medicinal And Edible Species, By *In Vitro* And *In Vivo* Tests. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*.

Archive of SID

www.SID.ir

88. Van Acker S.W.A., Van Balen G.P., Van den Berg D.J., Bast A and Van der Vijgh W.J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids, *Biochem. Pharmacol*: 56, 935-943.

89. Vazirian. M., Dianat, S., manayi, A., Ziari, R., mousazadeh, A., habibi, E., Saeidnia, S and Amanzadeh, Y. (2014). Anti-inflammatory effect, total polysaccharide, total phenolics content and antioxidant activity of the aqueous extract of three basidiomycetes. *Research Journal of Pharmacognosy*. 1: 15-21.

90. Vialle, A., Feau, N., Allaire, M., Didukh, M and Martin, F. (2009). Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Mol Ecol Resour*, 9, 99-113.

91. Vidovic, S., Zekovic, Z., Mujic, I., Lepojevic, Z., Radojkovic, M and Zivkovic, J. (2011). The antioxidant properties of polypore mushroom *Daedaleopsis confragosa*. *Central European Journal of Biology*. 6(4):575-582.

92. Wasser, SP. (2002). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biot:* 60: 258-74.

93. Wasser, S.P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J*, 37, 345–356.

94. Yamac, M and Bilgili, F. (2006). Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. Pharmaceutical Biology. 44(9): 660-667.

95. Yang, L and Zhang, L.-M. (2009) Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydr. Polym*: 76, 349–361.

96. Yeung, J.H.K and Or, P.M.Y. (2012). Polysaccharide peptides from Coriolus versicolor competitively inhibit model cytochrome p450 enzyme probe substrates metabolism in human liver microsomes. *Phytomedicine*. 19, 457–463.

Archive of SID

www.SID.ir

97. Yu L., Zhang B., Geza R., Szalvay K., Sun R., Janis J and et al, (2008). Protein HGF1 from edible mushroom *Grifola frondosa* is a novel 8kda class I hydrophobin that forms rodlets in compressed monolayers, *Microbiology*. 154, 1677-1685.

98. Zhao, J.Y., Feng, T., Li, Z.H., Dong, Z.J., Zhang, H.B and Liu, J.K. (2013). Sesquiterpenoids and an ergosterol from cultures of the fungus *Daedaleopsis tricolor*. *Nat. Prod. Bioprospect*. 3: 271-276.

Archive of SID

www.SID.ir

سپاسگزاری

این طرح با بودجه و حمایت مالی گروه تخصصی کشاورزی و منابع طبیعی جهاددانشگاهی و همچنین حمایت مالی جهاددانشگاهی خراسان رضوی و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران به انجام رسید. به دلیل اینکه دو مرکز مختلف مجری این طرح بودند، لذا مشکلات و چالش‌هایی در مسیر تصویب آن وجود داشت که با مساعدت و حسن نظر جناب استاد آقای دکتر یزدانی مدیر محترم گروه کشاورزی و منابع طبیعی و همیاری و همدلی همکاران دو مرکز مذکور به بهترین شکل مرتفع شد. همچنین از مساعدت جناب آقای دکتر شاهزاده فاضلی ریاست محترم مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران در تسهیل امور و انجام مشترک این طرح صمیمانه تشکر می‌گردد. این طرح در ابعاد مختلف میدانی و آزمایشگاهی انجام شد که نیازمند حضور چندین متخصص مختلف از قارچ شناسی تا بیولوژی مولکولی و بیوتکنولوژی کشاورزی بود. لذا مجریان این طرح از همکاری تمامی همکاران عزیز این طرح به ویژه جناب آقای دکتر مهدی‌زاده (در بحث جمع آوری و شناسایی مروفولوژیکی نمونه‌ها)، سرکار خانم دکتر نصر (به خصوص در بحث شناسایی مولکولی جدایه‌ها) و سرکار خانم شاه‌طهماسبی (به خصوص در بحث زراعی سازی و خالص سازی جدایه‌ها) صمیمانه تشکر و تقدیر می‌نمایند. همچنین از زحمات سرکار خانم صفری در زراعی سازی جدایه‌ها، آنالیزهای آماری و همکاری در گزارش پایانی این طرح تشکر و تقدیر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

پیوست‌ها

پیوست ۱: تعاریف و اصطلاحات

تعاریف و اصطلاحات اختصاصی قارچ شناسی که در سراسر این گزارش استفاده شده‌اند، به شرح ذیل می‌باشند.

- میسلیوم (Mycelium): میسلیوم به رشد رویشی قابل رویت با چشم غیر مسلح قارچ ماکروسکوپی کلاهک‌دار بر روی یک محیط کشت جامد یا مایع اطلاق می‌شود. مجموع میسلیوم (Mycelia) شبکه‌ای از توده میسلیومی است که سطح محیط کشت را می‌پوشاند و گاهی در زبان فارسی ریسه نیز خوانده می‌شود. هر میسلیوم خود از اجتماع چندین هیف (Hyphae) تشکیل شده و هر هیف در حقیقت یک واحد سلولی قارچ محسوب می‌شود.
- نژاد (Strain): به یک ژنوتیپ مشخص متمایز از یک گونه قارچی گفته می‌شود که در خصوصیات زراعی یا مورفولوژیکی خود تفاوت‌هایی با سایر نژادها در همان گونه دارد. نژادها معمولا به صورت کشت خالص میسلیومی تهیه می‌شوند. در این پژوهش، گاهی از اصطلاح سویه نیز به جای نژاد استفاده شده است که معادل با آن می‌باشد و به دلیل تخصص میکروبیولوژیکی برخی از همکاران این طرح می‌باشد. اما این نژادها یا سویه‌ها، قبل از تایید نهایی گونه توسط بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی، تحت عنوان اصطلاحات ایزوله (Isolate) یا جدایه از آنها نام برده شده است.
- اسپاون (Spawn): به رشد رویشی میسلیوم قارچ ماکروسکوپی کلاهک‌دار بر روی یک ماده زمینه‌ای از غلات یا بقایای لیگنوسلولزی اطلاق می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

- کمپوست (Compost) یا بستر کشت (Substrate): در حقیقت اصطلاح کمپوست غالبا برای مخلوط فرآوری شده متشکل از کاه گندم و کود مرغی (و سایر مکمل‌ها) برای رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای به کار می‌رود. قارچ دکمه‌ای یک تجزیه کننده ثانویه است که به معنای نیاز آن به تخمیر باکتریایی و قارچی قبل از استفاده از کمپوست است. اما بیشتر قارچ‌های ماکروسکوپی کلاهک‌دار مورد استفاده در این پژوهش از نوع تجزیه کننده اولیه هستند، یعنی قادرند از بقایای لیگنوسلولزی برای رشد خود مستقیما استفاده نمایند. لذا اصطلاح بستر کشت به مخلوطی از این بقایای لیگنوسلولزی گفته می‌شود که فرآیند کمپوستینگ را طی نکرده است.
- اندام باردهی (Fruiting bodies): تغییر رشد رویشی به رشد زایشی یک قارچ ماکروسکوپی منجر به ظهور اندام باردهی می‌شود. این اصطلاح، گاهی میوه‌دهی (به دلیل خوراکی بودن برخی از آنها) نیز گفته می‌شود. یک اندام باردهی در حقیقت متشکل از یک کلاهک (Cap) و یک پایه (Stem/Stalk) است. گاهی نیز از اصطلاح ماشروم (Mushroom) برای بیان اندام باردهی استفاده می‌شود و به همین دلیل است که اصولا قارچ‌های ماکروسکوپی، ماشروم‌ها نیز نامیده می‌شوند. تمامی اصطلاحات اندام باردهی، اندام میوه‌دهی یا ماشروم به یک معنا اشاره دارند و آن اندام زایشی قابل رویت گوشتی یک قارچ ماکروسکوپی است.
- پرده/غشای زیر کلاهک (Veil membrane): به غشای نازکی اطلاق می‌شود که زیر کلاهک قرار گرفته و در واقع اسپورها را می‌پوشاند. پس از بلوغ قارچ، این غشا پاره شده و موجب ظاهر شدن اسپورها می‌گردد و خود غشا به صورت یک حلقه (و گاهی ۲ حلقه) دور پایه قرار می‌گیرد. لذا در این گزارش، اصطلاحات حلقه، پرده یا غشای زیر کلاهک همگی به این ساختار اشاره دارند.

Archive of SID

www.SID.ir

- اسپور (Spore): اسپور که در اصطلاح عمومی فارسی هاگ گفته می‌شود، ابتدای‌ترین بخش تندش‌کننده یک قارچ کلاهک‌دار است که می‌تواند بازیدیسوپور (Basidiospore) یا کلامیدیسپور (Clamidiospore) یا از هر نوع دیگری باشد. تندش (Germination) اسپورها در محیط مناسب همراه با رطوبت موجب تشکیل هیف و سپس شبکه میسلیومی می‌شود. لایه‌ای که اسپورها بر روی آن تشکیل می‌شوند، هیمینیوم (Hymenium) نامیده می‌شود. در لایه هیمنیوم، سلول‌های بازیدیوم (Basidia) قرار دارند که همان سول‌هایی هستند که تبدیل به بازیدیسپور می‌شوند.

نقش اسپور (Spore print): اسپورهای بالغ یک قارچ ماکروسکوپی کلاهک‌دار در شرایط مناسب (بدون در معرض هوا بودن) می‌توانند بر روی یک کاغذ نقش ببندند که به این نقش (که معمولا به صورت شعاعی دیده می‌شود) نقش اسپور گفته می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

پیوست ۲: لوازم و ادوات نمونه‌برداری

لوازم و ادوات مورد استفاده جهت انجام نمونه‌برداری به شرح جدول زیر بود:

شماره	عنوان
۱	تهیه حداقل ۵۰ پتری‌دیش حاوی محیط کشت عصاره مالت در طی سفر
۲	تهیه حداقل ۵۰ پتری‌دیش حاوی محیط کشت عصاره کمپوست در طی سفر
۳	تهیه حداقل ۱۰۰ پتری‌دیش از هر دو محیط کشت فوق برای وا کشت[۱۸] در آزمایشگاه
۴	پاکت‌های کاغذی به تعداد لازم از حداقل سه سایز
۵	کیسه‌های پلاستیکی بزرگ رسمی به تعداد لازم برای قرار دادن پاکت‌های کاغذی
۶	دوربین عکاسی بعلاوه باتری اضافه و سه‌پایه
۷	دستگاه GPS بعلاوه باتری اضافه
۸	محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد
۹	اسید نیتریک
۱۰	آمونیاک
۱۱	آنیلین
۱۲	ظروف مخصوص برای نگهداری و حمل قارچ‌های ریز در طی سفر
۱۳	ظروف شکیل برای قارچ‌های موزه و هرباریوم
۱۴	دستگاه خشک‌کن میوه
۱۵	نشانگر اندازه و خط کش
۱۶	انعکاس دهنده و متمرکز کننده نور
۱۷	آینه جهت عکس در زوایا
۱۸	کرم دور کننده دارای بو جهت جلوگیری از نیش حشرات
۱۹	جعبه کمک‌های اولیه، آنتی‌هیستامین و غیره
۲۰	کوله، لباس، کفش مناسب و چوب‌دستی برای نفرات
۲۱	پلاستیک فریز و دستمال کاغذی

[18] Subculture

Archive of SID
www.SID.ir

شماره	عنوان
۲۳	سلفن دور پتری
۲۴	اره برای بریدن کنده‌های دارای قارچ برای موزه
۲۵	چاقوی نمونه‌برداری
۲۶	اسکالپل در دو سایز
۲۷	الکل و ظروف کوچک برای حمل و نگهداری آن
۲۸	کبریت یا فندک
۲۹	پیک‌نیک برای کشت بافت در جنگل یا محل اقامت
۳۰	سبد پارتیشن‌بندی شده برای جمع آوری و نگهداری قارچ‌های ریز
۳۱	برچسب
۳۲	چراغ قوه
۳۳	جیره غذای خشک، تن ماهی و غیره
۳۴	پتری‌دیش گاما استریل ۹ سانتی‌متری برای تهیه نقش اسپور
۳۵	دفترچه یادداشت نکات سفر، مارکر و خودکار
۳۶	مقداری فویل برش داده شده و استریل

Archive of SID

www.SID.ir

پیوست ۳. کلید مورفولوژیکی جدایه‌های قارچ

جنس *Armillaria*

Armillaria (Fr.) Staude, *Schwämme Mitteldeutschl.* 28: xxviii, 130 (1857)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Physalacriaceae

ب) گونه تیپ

Armillaria mellea (Vahl) P. Kumm., *Führ. Pilzk.* (Zerbst): 134 (1871)

پ) کلید شناسایی جنس *Armillaria* (Kuo, 2005)

1. Stem without a ring or cobweb-like ring zone.	*Armillaria tabescens*
1. Stem with a ring or ring zone. Go to 2	
2. Mature cap with prominent scales. Go to 3	
2. Mature cap smooth, with scattered fine hairs, or with tiny scales, but without prominent scales. Go to 4	
3. Found on hardwoods; distributed from the Appalachian Mountains eastward; rare; benign.	*Armillaria gemina* (see *Armillaria solidipes*)
3. Found primarily on conifers; widely distributed in northern North America; common; parasitic.	*Armillaria solidipes*
4. Cap color orange-brown; stem dark and colored like the cap; growing on hardwoods (especially species of *Alnus*) in western North America.	*Armillaria nabsnona* at Tom Volk's Fungi
4. Not as above. Go to 5	

Archive of SID

www.SID.ir

5. Stem with a thick, membranous ring; stem bases pointed due to growth habit in dense clusters; basidia *without* basal clamps. 5. Ring ephemeral or cobwebby; stem bases not pointed; (at least some) basidia basally clamped. Go to 6	*Armillaria mellea*
6. Pathogenic and parasitic, invading the wood of hardwoods (in the northeast) and conifers (in the Pacific Northwest) with black rhizomorphs; mushrooms typically fruiting from visible wood. 6. Harmlessly saprobic on hardwood (and occasionally conifer) roots east of the Rocky Mountains; not displaying prominent black rhizomorphs in the host wood; mushrooms often appearing terrestrial, though occasionally fruiting from visible wood. Go to 7	*Armillaria sinapina* At Tom Volk's Fungi
7. Mating in the laboratory with previously identified isolates of *Armillaria gallica*; widely distributed east of the Rocky Mountains.	*Armillaria gallica*
7. Mating in the laboratory with previously identified isolates of *Armillaria calvescens*; northeastern in distribution.	*Armillaria calvescens* (see *Armillaria gallica*)

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه *Armillaria mellea* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

مشخصات ماکروسکوپی مشخص این نمونه‌ها از جمله عدم وجود فلس بر روی کلاهک (که در عوض، وجود پرزهای ریز مشهود بود)، وجود حلقه رو پایه و رشد خوشه‌ای از مشخصات متمایز کننده این گونه بود. بررسی مشخصات میکروسکوپی اسپورهای نمونه‌های جمع آوری شده این گونه نشان داد که اسپورها به ابعاد:

Archive of SID
www.SID.ir

6.8-9 (-10.3) x 4.3-5.9 µm, [8.13 ± 0.51 x 5.17 ± 0.35, Q = 1.4-1.81, Qm = 1.58 ± 0.09, n = 30] بوده که منطبق با نمونه تیپ این گونه بودند.

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Armillaria* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	۱۷۳	*Armillaria mellea*	درحال انجام	ساری، زیر آب N36 14 17.5 E53 03 19.3, 860m به لاجیم
۲	۱۷۵	*Armillaria mellea*	انجام نشده	ساری، زیر آب N36 14 15.9 E53 03 19.4, 864m به لاجیم
۳	۱۸۹	*Armillaria mellea*	انجام نشده	بهشهر جنگل N36 39 17.0 E53 35 57.0, 526m عباس آباد

[1] این کدها مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۴ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های رامسر، بهشهر، ساری و کلاردشت مازندارن در آبان ۱۳۹۵ است.

Archive of SID
www.SID.ir

ث) مشخصات میسلیومی اولیه (کشت بافت و خالص‌سازی اولیه در محل نمونه‌برداری) گونه *Armillaria mellea* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

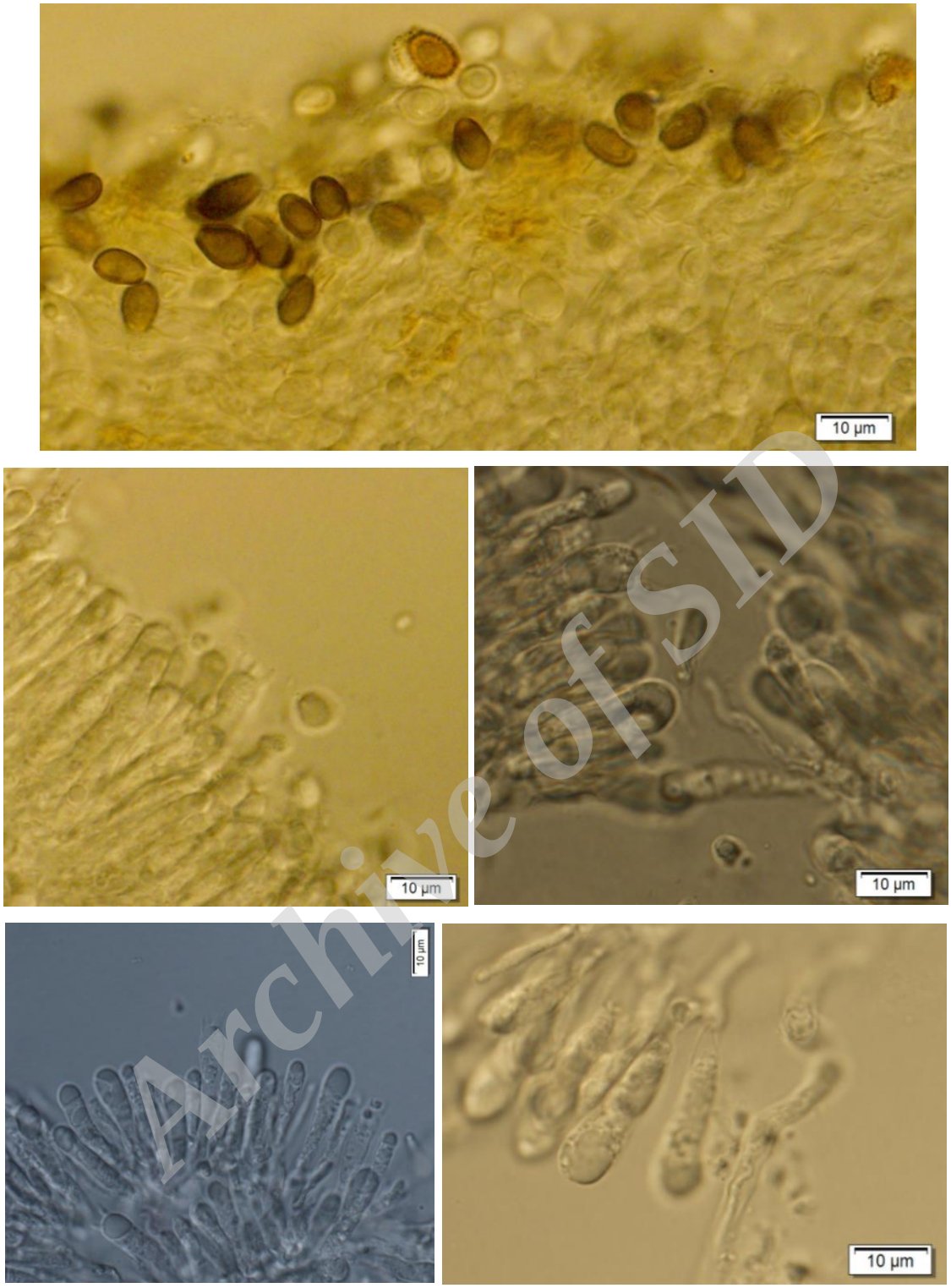
نمونه کد ۱۷۳ دارای ریزمورفی قوی اما با رشد کند بود در حالیکه نمونه کد ۱۷۵ دارای میسلیوم ضعیف و نامناسبی بود. نمونه ۱۸۹ میسلیوم قابل قبولی داد اما ریزومورف نداشت و لذا به نظر مشکوک می‌آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Armillaria mellea*: از بالا به پایین: نمونه ۱۸۹، نمونه ۱۷۵، نمونه ۱۷۳. نشـانگر اندازه: یک سانتی‌متر. مشخصات منطقه جمع‌آوری در جدول ۴-۵ ارائه شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Armillaria mellea*

از بالا به پایین اسپورهای کد ۱۸۹، بازیدیوم‌های کد ۱۷۵، بازیدیوم‌ها و پروبازیدیوم‌های کد ۱۷۳. نشانگر اندازه: ده میکرومتر. تصاویر میکروسکوپی توسط دکتر مهدیزاده در آزمایشگاه تحقیقات قارچ دانشگاه تربیت مدرس ثبت شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جنس *Agrocybe* یا *Cyclocybe*

Agrocybe Fayod, *Annls Sci. Nat.*, Bot., sér. 7 9: 358 (1889)
Cyclocybe Velen., *Novitates Mycologicae*: 122 (1939)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Bolbitiaceae;

ب) گونه تیپ

Cyclocybe aegerita (or *Agrocybe cylindracea*) (V. Brig.) Vizzini, *Index Fungorum* 154: 1 (2014)

پ) کلید شناسایی جنس *Agrocybe* (Kuo, 2005)

1. Growing in clusters on wood (often the wood of willows or poplars); cap medium sized; stem with a sturdy ring; known from (and cultivated commercially in) Europe but also appearing in North America in southern hardwood forests or under baldcypress.

Agrocybe cylindracea

= Agrocybe aegerita

1. Not completely as above. Go to 2

2. Partial veil present, sometimes forming a ring or ring zone, or leaving fragments on the cap margin. Go to 3

2. Partial veil absent. Go to 13

3. Cap dark brown in all stages of development; gills running down the stem. *Agrocybe erebia*

3. Cap paler; gills attached to the stem or pulling away from it, but not running down it. Go to 4

4. Growing in grass. Go to 5

4. Growing elsewhere. Go to 7

Archive of SID

www.SID.ir

5. Stem only a few mm thick; cap small (1-3 cm), yellowish brown or paler; veil evidence very quickly disappearing; cap surface red or pinkish with KOH; spores 9-13 µ long.

Agrocybe pediades

5. Stem usually thicker and cap usually bigger than above; veil evidence fairly persistent on cap margin and/or stem; cap surface not red or pinkish with KOH; spores variously sized.

Go to 6

6. Cap white or very pale tan; most spores 10-14 µ long; clearly decomposing grass litter. *Agrocybe molesta*

= *Agrocybe dura*

6. Cap usually darker than above; most spores 8-11 µ long; possibly decomposing buried wood (trees, woodchips, roots of former trees, etc. in the vicinity). *Agrocybe praecox* cluster

7. Mushroom identifier is willing to accept that recent investigations suggest the futility of determining subsequent Agrocybe species on the basis of morphology (physical features, assessed with and without a microscope). Go to 8

7. Mushroom identifier likes old-school morphology, has a microscope, and doesn't care that the subsequent species, as currently defined, are probably invalid. Go to 11

8. Growing in western North American forests in spring (account for elevation) under conifers or aspen; decomposing fragmented wood litter. Flynn & Miller BS II

see *Agrocybe praecox* cluster

8. Not as above. Go to 9

9. Growing in eastern North American hardwood forests (often with maples present); decomposing fragmented wood litter or growing from logs. Flynn & Miller BS III

see *Agrocybe praecox* cluster

Archive of SID

www.SID.ir

9. Not as above. Go to 10

10. Growing in woodchips in urban settings across North America, or in disturbed ground (well worn paths, etc.) in spring. Flynn & Miller BS I

see *Agrocybe praecox* cluster

10. Ecology not accounted for by choices above. Go to *Agrocybe praecox* cluster

11. Stem 2-4 mm thick; growing in marshes and bogs; ring thin but persistent; spores 9-11 µ long; cystidia broadly fusoid-ventricose. *Agrocybe paludosa*

11. Stem thicker than above; habitat variable but not usually in marshes or bogs; ring persistent or not; microscopic characters variable. Go to 12

12. Cap moist, dark yellowish brown when young, often wrinkled or veined near the center; ring persistent; cystidia clavate-mucronate, occasionally with fingerlike projections. *Agrocybe acericola*

12. Cap dry, paler than above when young, the center not wrinkled or veined; ring sometimes collapsing or disappearing; cystidia utriform, without projections. *Agrocybe praecox*

13. Growing in clusters on the dead wood of hardwoods; young cap dark brown. *Agrocybe firma*

13. Growing elsewhere; young cap not dark brown. Go to 14

14. Taste bitter; growing on dung or in greenhouses.

Agrocybe amara

14. Taste mild or mealy; growing elsewhere. Note: Some of the subsequent species are morphological species unsupported by substantial ecological differences, and might easily collapse with mating and/or DNA studies. Go to 15

Archive of SID

www.SID.ir

15. Cap 5-10 cm wide; stem .5-1 cm thick; found east of the Great Plains. *Agrocybe sororia*

15. Cap and stem smaller than above; variously distributed. Go to 16

16. Stem with a long "root" or rhizomorphs attached to a fleshy underground mass (a sclerotium); gills distantly spaced; spores 8-10 x 4-5 µ; found in gardens. *Agrocybe arvalis*

16. Not completely as above. Go to 17

17. Cap pale, conspicuously wrinkled and pitted; found in lawns and grassy areas in subtropical and tropical areas; spores 15-17 x 7.5-9 µ. *Agrocybe retigera*
at Agaricales of the Hawaiian Islands

17. Not completely as above. Go to 18

18. Spores 7.5-9 x 5-6 µ; cap fleshy (about like Stropharia coronilla in thickness).
Agrocybe vervacti
(photos only)

18. Spores 9-13 (+) x 6.5-8 µ; cap thin. *Agrocybe pediades*
(= A. semiorbicularis)

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه *Cyclocybe cylindracea* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

مشخصات ماکروسکوپی مشخص این نمونه‌ها از جمله داشتن کلاهک متوسط و حلقه مشخص روی پایه از مشخصات متمایز کننده گونه *cylindracea* بود. این گونه اخیرا از جنس *Agrocybe* به جنس *Cyclocybe* انتقال یافته است. بررسی مشخصات میکروسکوپی اسپورهای نمونه‌های جمع‌آوری شده این گونه نشان داد که اسپورها به ابعاد:

Archive of SID
www.SID.ir

6.3-9.6 x 3.8-5.5 µm, [7.91 ± 0.85 x 4.7 ± 0.47, Q = 1.46-2.02, Qm = 1.69 ± SD, n = 30] بودند که حاکی از تعلق آنها به گونه *Cyclocybe cylindracea* بود.

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Cyclocybe* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	Darabkola 20	*Cyclocybe cylindracea*	*Cyclocybe sp.*	N36 28.3 E53 20.224, 852m، جنگل‌های ساری

[1] این کد مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۲ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های ساری در ۳۱ فروردین ۱۳۹۵ است.

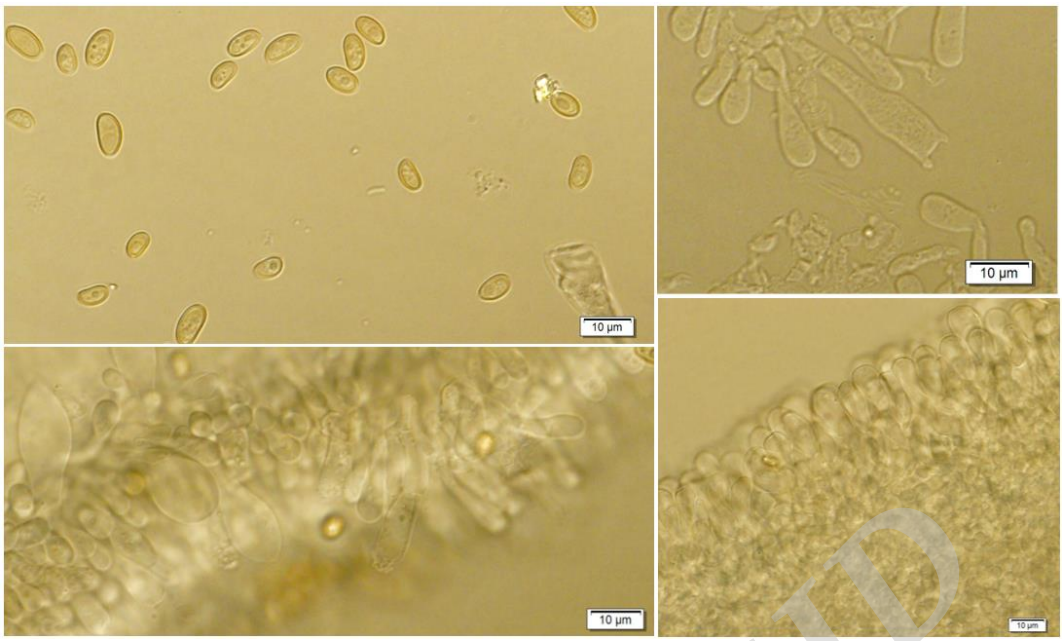
ث) مشخصات میسلیومی اولیه (کشت بافت و خالص‌سازی اولیه در محل نمونه‌برداری) **نمونه‌های بدست آمده از جنس *Cyclocybe*** جمع‌آوری شده در این پژوهش:

نمونه *Cyclocybe sp.* دارای کشت بافت موفقی بود و وضعیت غیر عادی در میسلیوم‌ها مشاهده نشد

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Cyclocybe cylindracea*، نمونه *Cyclocybe sp.* نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.

Archive of SID

www.SID.ir



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Cyclocybe cylindracea*: از بالا به پایین اسپورها، بازیدیوم‌ها، کیلوسیستدیدهای نمونه *Cyclocybe sp.* . نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Pholiota*

Pholiota (Fr.) P. Kumm., Der Führer in die Pilzkunde: 22, 83 (1871) [MB#18263]

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Strophariaceae; Pholiota

ب) گونه تیپ

Pholiota squarrosa, (Oeder) P. Kumm., Der Führer in die Pilzkunde: 84 (1871)

پ) کلید شناسایی جنس *Pholiota* (Kuo, 2005)

Strips *Pholiota*

1. Spores 7-10(11) x 4.5-5.5 µ, very dark brown in KOH (*Agaricus*-like), and with a prominent apiculus	Stirps *Fulvosquamosa*
1. Spores not as above	Go to 2
2. Pileus and subhymenium both lacking any gelatinized layers; subhymenium more or less cellular	Stirps *Schraderi*
2. Not as above	Go to 3
3. Pileus cuticle lacking a gelatinous layer; subhymenium gelatinous	Stirps *Squarrosa*
3. Pileus with a gelatinous subcutis or pellicle	Go to 4
4. Pileus with a gelatinous subcutis often obscured until near maturity by dry fibrillose-scaly epicutis	Stirps *Squarrosoides*
4. Pileus with a gelatinous cutis which is obvious at an early stage	Stirps *Adiposa*

Stirps *Fulvosquamosa*

1. Only one species	*P. fulvosquamosa*

Stirps *Schraderi*

1. Spores 8-10 x 4.5-5.5 µ	*P. sola*
1. Spores smaller (6-8 x 4-4.5 µ)	Go to 2
2. Pleurocystidia 38-78 x 10-14 µ	*P. schraderi*
2. Pleurocystidia smaller and at least some of them chrysocystidia	*P. scabella*

Stirps *Squarrosa*

Archive of SID

www.SID.ir

1. Spores 6-8 µ long; some pleurocystidia hyaline in KOH and evenly refractive throughout	*P. squarrosa*
1. Spores smaller (5-6.5 µ long); pleurocystidia not as above	*P. kodiakensis*

Stirps *Squarrosoides*

1. Spores 6-8 x 4-4.5 µ, oblong to elliptic in face view (see *P. angustipes* also)	*P. rigidipes*
1. Spores smaller or more ovate in face view	Go to 2
2. Spores 6-7.5 x 4-4.8 (5) µ, ovate in face view (see *P. simulans* also)	*P. penningtoniana*
2. Spores 4-6 x 2.5-4 µ	Go to 3
3. Pileus dark grayish brown to dark cinnamon; stipe with scales colored like those on pileus	Go to 3a
3. Not as above	Go to 4
3a. Stipe not staining when handled	*P. terrestris*
3a. Stipe staining russet when handled	*P. subcastanea*
4. Pileus with coarse tawny scales	Go to 5
4. Pileus with fine scales paler than in above choice	Go to 6
5. Inner veil yellow; pileus ground color ochraceous	*P. barrowsii*
5. Inner veil white; pileus ground color pallid	*P. squarrosoides*
6. Spores 4-5 x 2.5-3 µ	*P. romagnesiana*
6. Spores 5-6.5 (7) x 3.5-4 (4.5) µ (see *P. simulans* also)	*P. angustifolia*

Stirps *Adiposa*

1. Spores 5-6 (8) µ wide	Go to 2
1. Spores mostly 2.5-5 µ wide	Go to 3
2. Spores 6-8 µ wide	*P. aurivelloides*
2. Spores 4.5-6 µ wide	*P. aurivella*
3. Spores 4-6 x 2.5-3.5 µ	Go to 4
3. Spores (5) 6-8 (9) µ long	Go to 4
4. Pileus gills and stipe picric yellow; stipe with well-defined dry picric yellow recurved squamules	*P. flammans*
4. Pileus darker (ochre yellow); scales on stipe gelatinous	*P. adiposa*

Archive of SID

www.SID.ir

5. Taste bitter; some context hyphae with inclusions resembling those of chrysocystidia	*P. lucifera*
5. Taste mild to fungoid or somewhat unpleasant; hyphae not as above	Go to 6
6. Stipe connate and pointed below; with a thin viscid layer over lower part of stipe	Go to *P. connata*
6. Stipe not as above	Go to 7
7. Lamellae with pale yellow margins and pallid faces when young; stipe at first with scattered gelatinous scales below the annulus or annular zone	*P. hiemalis*
7. Not as above	Go to 8
8. Base of stipe surrounded by olive-yellow to tawny pubescence; pileus scales broad at base (± 3 mm)	*P. subvelutipes*
8. Not as above	Go to 9
9. Young lamellae distinctly yellow	Go to 10
9. Young lamellae pallid to white at first	Go to 12
10. Pileus whitish; scales yellow	see *P. caespitosa*
10. Pileus rich yellow, scales fulvous	Go to 11
11. Some specimens in a cluster with a thick heavy subpersistent annulus; on wood of conifers	*P. filamentosa*
11. Annulus never formed (veil-line merely a thin fibrillose zone); mostly on wood of hardwoods	*P. squarroso-adiposa*
12. Pileus covered with broad tawny scales; young gills pallid; stipe increasingly scaly downward from veil line; on wood of conifers	*P. abietis*
12. Not as above	Go to 13
13. Pileus squamulose with minute dot-like scales; stipe white to avellaneous	Go to 14
13. Not as above	Go to 15
14. Fusoid chrysocystidia scattered to abundant in hymenium; some cheilocystidia capitate and head with thickened bright yellow walls revived in KOH	*P. simulans*
14. Cheilocystidia not as above; pleurocystidia clavate to filamentous	*P. angustipes*
15. Hyphae of pileus context bright red in Melzer's	*P. limonella*
15. Hyphae not as above	see *P. rigidipes*

Archive of SID

www.SID.ir

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنس ***Pholiota*** در این پژوهش:

مشخصات ماکروسکوپی با توجه به کلید مورفولوژیکی حاکی از تعلق نمونه‌های ۱۴۲ و ۱۳۵ به جنس *Pholiota* بودند. همچنین اسپورهای نمونه‌های جمع آوری شده به ابعاد:

6.2-7.5 (-8.3) x 3.6-4.7 µm, [6.97 ± 0.34 x 4.22 ± 0.26, Q = 1.48-1.87, Qm = 1.65 ± 0.11, n = 30]

بودند که نشان از تعلق نمونه‌های جمع‌آوری شده به جنس *Pholiota* داشت .

ث) مشخصات میسلیومی اولیه (کشت بافت و خالص‌سازی اولیه در محل نمونه‌برداری) **نمونه‌های بدست آمده از جنس *Pholiota*** جمع‌آوری شده در این پژوهش:

نمونه ۱۴۲ دارای میسلیوم مطلوب و کشت بافت موفقی بود اما نمونه ۱۳۵ تولید میسلیوم نکرد.

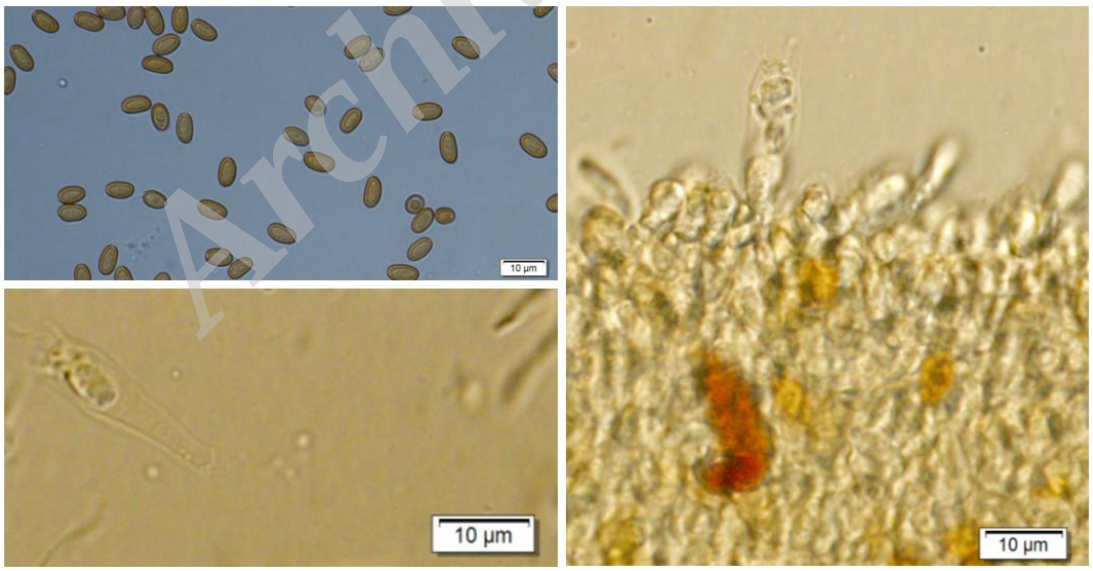
فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Pholiota* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	۱۴۲	تعلق به جنس *Pholiota*	*Pholiota aurivella*	N36 52 32.6 E50 33 30.7, 669m، صفارود رامسر
۲	۱۳۵	تعلق به جنس *Pholiota*	-	N36 50 44.5 E50 33 37.2, 1239m، صفارود رامسر

[1] کد ۱۴۲ مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۴ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های صفارود رامسر در ۶ آبان ۱۳۹۵ است. کد ۱۳۵ متعلق به نمونه‌ای است که در همان تاریخ و منطقه جمع‌آوری شده است اما کشت بافت آن موفق نبود و لذا در لیست ۴۲ نمونه موفق جدول ۴-۴ نیامده است.

Archive of SID
www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Pholiota sp.* نمونه ۱۳۵. نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Pholiota sp.* نمونه ۱۴۲ بالا سمت چپ: اسپورها، پایین: بازیدیوم‌ها؛ نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID
www.SID.ir

جنس *Lycoperdon*

Lycoperdon Pers., Ann. Bot. (Usteri) 1: 4 (1794)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi, Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycetes, Agaricomycetidae, Agaricales, Agaricaceae, Lycoperdon

ب) کلید شناسایی جنس *Lycoperdon* (Kuo, 2005)

Fruiting body typically globose to pyriform; peridium composed of two layers, the outer one consisting of spines, warts, granular or felty floccose material which usually sloughs off at maturity; inner wall forming a papery, thin but tough spore case; typically opening at the apex by a pore but occasionally by irregular fissures. Sterile base prominent in most species.

1a. Sterile base present and chambered (lacunae)

.....Go to 4

1b. Sterile base absent or, if present, not chambered

.....Go to 2

2a. Sterile base present, context felty without chambers

.....*Lycoperdon ericetorum*

(also known as *Lycoperdon cepaeforme*)

1 to 3.5 cm broad, 2-4.5 cm high, turbinate to pyriform, attached by rhizomorph quite strongly. Whitish to light brown at maturity; surface covered by a sparse coating of short spines and minute warts and granules; becoming glabrous, apical pore round. Gleba olive-brown when mature, cottony; sterile base well developed, 1/3 of fruit body, yellow-brown, felty with no chambers. First reported specimen found Dec. 1980 at Ocean Shores, Washington.

2b Sterile base absent

.....Go to 3

3a Exo closely covered with white spines, appearing furry, later peeling away from endo

.....*Lycoperdon curtisii*

(also known as *Vascellum curtisii*)

1 to 2 cm broad, less high; depressed globose to pulvinate, plicate below; without conspicuous rhizomorphs; exo white; cracking and peeling away in chunks as in *L. marginatum*, revealing smooth endo which is ultimately medium brown and opens by a small pore. Sterile base absent. Gregarious in grass (Leavenworth, Washington), later summer and fall.

Lycoperd on curtisii

3b Exo scurfy, with small warts and granules, some falling off, some drying and remaining, and not separating from endo

.....*Lycoperdon pusillum*

(also known as *Bovista californica*)

1 to 3.5 cm broad, 1 to 3 cm high; depressed globose, somewhat pointed at base, holding small mass of rhizoids and soil. White to grayish white becoming red-brown to dull brown with obscure spotting at maturity; first smooth then breaking into areolae from center of top out and down. Spore sac relatively smooth but retaining persistent remains of exo as minute particles seen under a hand lens. Pore crenulate. Gleba olive brown; powder olive brown. Sterile base none. On pastures and idle lands; summer and fall; densely gregarious to clustered. Rare in Oregon; two colonies at Snake Lake Nature Center in Tacoma Washington, Aug. 1979.

4a (1a) Exoperidium peeling away from spore case

..... Go to 5

4b Exoperidium not peeling away from spore case

..... Go to 6

5a Fruiting body stipitate / capitate

.....*Lycoperdon nettyana*

2 to 3 cm broad, 3 to 4 cm high, stipitate-capitate with upper portion hemispherical, medium brown, covered with small, (more or less) regular granular patches that impart light grayish brown color; granular exoperidium interspersed with short conical spines and rounded buttons about 2 mm apart. Exoperidium at maturity splitting irregularly across the apex and peeling or flaking away. Endoperidium, when exposed, lustrous, smooth, light grayish yellowish brown, persistent;

Archive of SID

www.SID.ir

apical pore soon forming, circular, less than 1 cm diam. Pseudostipe tapering to base, attached to substrate by white rhizomorphs; surface pallid with scattered dark granules and reduced gland-like projections. Subgleba whitish, pigmented in uppermost 5 mm, with empty loculae less than 1 mm across; distinctly separated from gleba by a thin layer of collapsed loculae which is central elevated about 2 mm at the base of the pseudocolumella. Gleba grayish brown to moderate brown near or at maturity, with a distinct pseudocolumella rising to near the apex. Collected on soil in woodland clearings, scattered to cespitose, autumn. Cispus watershed, Lewis County, Washington.

5b Fruiting body depressed globose

.....*Lycoperdon marginatum*

(also known as *Lycoperdon candidum*)

1 to 5 cm broad, less high; depressed globose, plicate below with occasional projection downward. Exo white; cracking and flaking off at maturity in large chunks to reveal a spore sac which is smooth to obscurely pitted and opens by a small apical pore. Sterile base well-developed with chambers 1 mm across. On sandy soil; summer and fall; scattered to numerous, even cespitose. Michael Beug Idaho and western Montana.

6a (4b) Growing on wood or wood debris

.....*Lycoperdon pyriforme*

1.5 to 3 cm broad; 2 to 3 cm high; pyriform to subglobose; may be plicate at juncture of enlarged portion with stipe-like base. Connected to substrate by numerous white rhizomorphs. Pallid to tawny brown immature, darker rusty brown at maturity -- some yellowish; areolate patches darker. Exo breaking into areolate patches that divide into smaller units, which on drying form minute granules. At times exo over apex consists of small spines and granules. Remains of exo relatively persistent and rough to touch. Apical pore slow to form, often irregular. Sterile base slight to prominent depending on shape. On wood or sawdust on ground, cespitose to scattered, September to heavy frost. Old cases persist to next summer. **REMARKS** *Morganella subincarnata* (Peck) Kreisel and Dring (= *Lycoperdon subincarnatum* Peck) also grows on wood but according to Arora has cinnamon-buff to brown spines when young, conspicuous pits at maturity (after spines have worn off), and sterile base that is well-developed to practically absent. It is found mainly in eastern North America but has been reported from BC: confirmation is needed.

6b Growing terrestrially

..... Go to 7

7a Opening considerably larger than a pore, with stellate lobes or uneven margins, widening almost full breadth of body which is mostly turbinate or urn shaped, as broad as high

.....See VASCELLUM

7b Opening consisting of classic pore less than 1 cm across, rarely more; fruit bodies mostly stipitate

.....Go to 8

8a Exo spines lavender

.....*Lycoperdon peckii*

1.5 to 4 cm across; to 5 cm high; obovoid to turbinate, sterile base often stipe-like (shape same as *L. perlatum*). Spiny coat is purplish lavender to near maturity then changing to buffy brown. Background and lower part white until near maturity. Covered with tapering spines to 1.5 mm long which split at base into 2-4 parts and remain joined at tips. Easily rubbed off, leaving pale, smooth, circular spots surrounded by minute granular warts and dots. Opening by apical pore. Sterile base occupying 1/2 of body. Terrestrial, fall, normally eastern species, rare in Northwest. Needs confirmation.

8b Exo blackish, brown, gray or pallid

.....Go to 9

9a Exo fuscous to black

.....*Lycoperdon foetidum*

(also known as *Lycoperdon nigrescens*)

1 to 3 cm broad, 2 to 5 cm high; pyriform to globose. Spines fuscous to black, background yellowish; spore sac grayish tan. Spines very fine and pointed, densely spaced over upper part, surrounded by granular material. Spines are not cone-shaped but more polygonal, with tips becoming dried, fine and curled. Spore sac smooth, papery, opening by apical pore. Sterile base well developed with obvious chambers. On duff and debris in dense conifer forests, Pacific Coast. At least 3 varieties. Common at times.

9b Exo brown, gray or pallid

.....Go to 10

Archive of SID

www.SID.ir

10a Exo across top consisting of fine spicules which degrade to a mealy covering over the margin and down the stipe

.....Go to 11

10b Exo with stout spines to 6 mm long, at least over top

.....Go to 12

11a Exo spicules and granules soon wearing away; fruit body large (to 12 cm high); capitate; rhizomorphs large and strong

.....*Lycoperdon floccosum*

Stipitate / capitate to pyriform. In the specimen described: head to 5 cm broad, stipe below head 2 cm, stipe above base compressed laterally, 3.5 cm by 5.5 cm across; height to 12 cm. Sulcate below head and perhaps at base. Rhizomorphs large and strong. Whitish, with surface over top covered with very small hairy projections less than 0.5 mm long, degrading to a mealy covering over the margin and down onto the stipe. Peridium 0.5 to 1 mm thick in fresh specimens most of which is exo; endo very thin; the two layers not separating on maturing and drying. Spicules and mealiness of head soon wearing away. Sterile base well-developed, lacunae to 1 mm, subgleba extending up into head convexly. Dark gray-brown. Sandy soil along river bank, under trees, one cluster of several sporocarps. Federation Forest on White River, Pierce County, Washington, 1980. Only report in Northwest to date.

11b Exo spicules and granules persistent, reducing on drying; fruit body rarely over 6 cm high; non-capitate; rhizomorphs present but small

.....*Lycoperdon umbrinum*

2.5 to 5 cm broad, 3 to 8 cm high, base 1 to 4 cm across; pyriform, tapering or sometimes almost globose; often sulcate to plicate below. White to yellowish; spore sac yellowish to dull brown in age. Exo with scurfy or granulose coating mixed with very slender short spines which are relatively persistent or finally breaking up into concentric zones on base or areolate patches over the top. Eventually disappearing to leave smooth spore sac with apical pore. Gleba medium brown to deep brown showing evidence of pseudocolumella, cottony, confined to upper third of interior. Sterile base occupying entire tapered base and extending up sides to widest part. Violaceous medium gray; lacunae open, irregular, less than 1 mm; fusing into fertile tissue without demarcation. Solitary to gregarious or subcespitose on leaf mold under conifers, occasionally on wood; Sep. to Nov.; variable; W. Montana and Oregon and W. Washington.

12a (10b) Some spines joined at tips; spines fall away from spore sac but remain on stipe

.....*Lycoperdon pulcherrimum*

2 to 5 cm broad, 3 to 4.5 cm high; pyriform to sub-globose over a narrowed, often plicate base; attached by white rhizomorphs. Exo white, spore sac dark purple brown. Exo consists of dense coating of spines 4-6 mm long, slender, fascicled, joined at the tips. Exo falls away at maturity to expose smooth papery tough spore sac, opening by apical pore which enlarges. "Stipe" remaining covered with spines. Well-developed sterile base turning purple brown in age. On humus under hardwoods in fall. Reported from Washington and W. Montana. Needs confirmation.

12b Spines solitary, larger ones falling away readily, leaving round white scars; stipe without spines

.....*Lycoperdon perlatum*

(also known as *L. gemmatum*)

2.5 to 6 cm broad, 3 to 7 cm high on stipe-like sterile base half as wide; typically obovoid, turbinate or pyriform, top narrowed abruptly to "stipe", often sulcate to plicate from widest point down onto base. White with spines brown in age before dropping off. A variety west of Cascades with brown spines in immature stage. Another variety is gray overall. Spore sac yellowish to dark avellaneous. Exo consists of sharp soft spines with round bases (cones) between which appear smaller cones, warts or granules. Larger cones deciduous, leaving pale round spots, more so on top. Spore sac becoming almost smooth, opening with apical pore. Sterile base well-developed, with chambers 1 mm across, chocolate brown in age. Solitary to cespitose on humus, often in arcs or fairy rings; in conifer or hardwood forests or in pastures or other turf; Aug. to late Oct.

Archive of SID

www.SID.ir

پ) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنس *Lycoperdon* در این پژوهش:

مشخصات ماکروسکوپی با توجه به کلید مورفولوژیکی حاکی از تعلق نمونه‌های جمع آوری شده به جنس *Lycoperdon* و جنس *Scleroderma* بود. اسپورهای نمونه‌های جمع آوری شده به ابعاد 8.8-12.6 (-13.1) x 8.6-12.6 (-13.2), [10.74 ± 0.91 x 10.25 ± 0.94 , Q= 0.92-1.15, Qm = 1.05 ± 0.06, n = 30] بودند.

ت) مشخصات میسلیومی اولیه (کشت بافت و خالص‌سازی اولیه در محل نمونه‌برداری) **نمونه‌های بدست آمده از جنس** *Lycoperdon* **و** *Scleroderma* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

نمونه ۱۵۸ دارای میسلیوم شبیه به گونه‌های جنس آگاریکوس بود. رشد میسلیومی مطلوب اما با سرعت رشدی پایین و شکل هندسی آن خطی بود. نمونه Royan 5 رشد میسلیومی مطلوبی داشت.

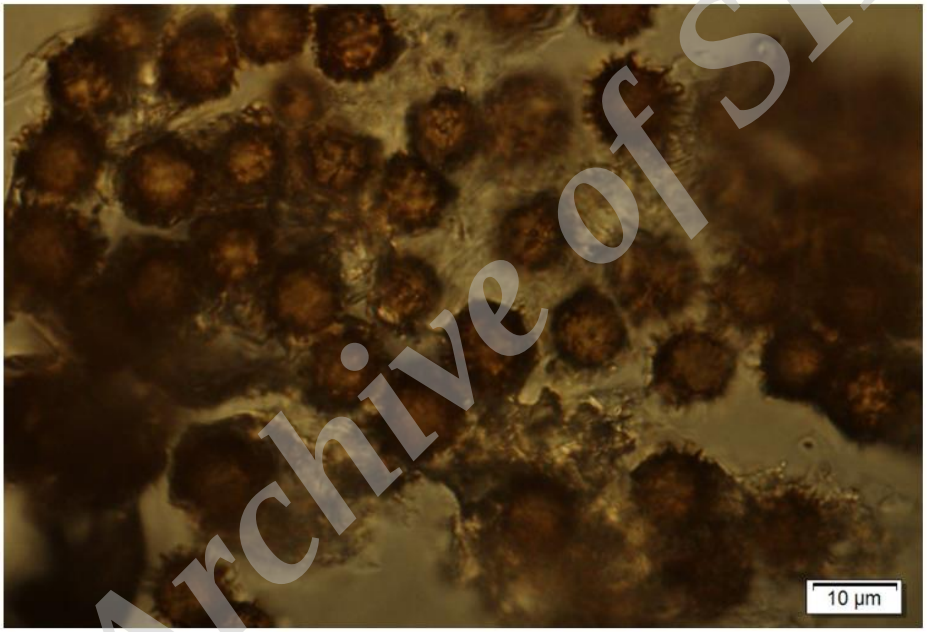
فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Lycoperdon* **و** *Scleroderma* **در این پژوهش**

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	۱۵۸	تعلق به جنس *Lycoperdon*	*Lycoperdon pyriforme* voucher UBC F28394	N36 52 32.6 E50 33 30.7, 669m، صفارود رامسر
۲	Royan5	تعلق به جنس *Scleroderma*	-	N36 50 44.5 E50 33 37.2, 1239m، صفارود رامسر

[1] کد ۱۴۲ مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۴ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های صفارود رامسر در ۶ آبان ۱۳۹۵ است. کد ۱۳۵ متعلق به نمونه‌ای است که در همان تاریخ و منطقه جمع‌آوری شده است اما کشت بافت آن موفق نبود و لذا در لیست ۴۲ نمونه موفق جدول ۴-۴ نیامده است.

Archive of SID
www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی انواع توپ پفکی ها:، سمت چپ: نمونه 158، سمت راست: نمونه royan5 نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Scleroderma sp.*: اسپورهای royan5. نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Macrolepiota*

Macrolepiota Singer, Pap. Mich. Acad. Sci. 32: 141 (1948) [1946]

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Agaricaceae

ب) گونه تیپ

Macrolepiota procera (Scop.) Singer, Pap. Mich. Acad. Sci. 32: 141 (1948)

پ) کلید شناسایی **برخی گونه های** جنس *Macrolepiota* (Nauta *et al.*, 2001)

1. Stipe with granules,squamulose zig-zag bands, either concolorous with background, or constrasting in colour

2. Stipe covering not or hardly contrasting with background; pileus with granular squamules or patches or a starshaped patch covering most of the surface

3. Annulus thin and simple, white; pileus (pale) brown at centre, pale buff to cream around centre, with a pale star-shaped pattern on whitish background; stipe covering indistinct; clamp-connections often present at base of basidia ..... 5. M. excoriata

3. Annulus thick, often with double crown, but upper part not always well developed, with coloured patches on underside; pileus colour variable, with granular aspect, which may form a star-shaped pattern on whitish background; stipe with a banded pattern; clamp-connections rarely

KEY TO THE SPECIES

1. Stipe with granules, squamulose zig-zag bands, either concolorous with background, or contrasting in colour
   2. Stipe covering not or hardly contrasting with background; pileus with granular squamules or patches or a star-shaped patch covering most of the surface
      3. Annulus thin and simple, white; pileus (pale) brown at centre, pale buff to cream around centre, with a pale star-shaped pattern on whitish background; stipe covering indistinct; clamp-connections often present at base of basidia ..... **5. M. excoriata**
      3. Annulus thick, often with double crown, but upper part not always well developed, with coloured patches on underside; pileus colour variable, with granular aspect, which may form a star-shaped pattern on whitish background; stipe with a banded pattern; clamp-connections rarely present at base of basidia .. **4. M. mastoidea**
   2. Stipe covering dark, brown or greyish; pileus either with a dark brown granulose, patchy covering, or with distinct squames and squamules on top of a radially fibrillose background
      4. Pileus brown granulose, and overall pattern either star-shaped or more irregularly patchy ... **4. M. mastoidea**
      4. Pileus with distinct squames and squamules lying on top of or at the end of radially oriented fibrils

Archive of SID

www.SID.ir

5. Pileus greyish brown to pale beige, strongly radially fibrillose, with loose-lying grey-brown patches of universal veil around centre . . . . . **3. M. fuliginosa**
5. Pileus with brown to vinaceous brown squamules on pale background, around central calotte with concentrically arranged small squames, at the end of short fibrils
6. Pileus and stipe with brown squamules on whitish background; stipe not reddening on scratching **1. M. procera**
6. Pileus and stipe with dark brown squamules with reddish, vinaceous tinges; stipe becoming red when scratched . . . . . **2. M. permixta**

1. Stipe smooth, without granules, bands etc.
7. Lamellae and spores of mature specimens green; spores with wide truncate apex **Chlorophyllum molybdites**
7. Lamellae and spores not changing colour with aging; spores with narrow truncate or rounded apex
8. Annulus thin and simple, not thickened with a double edge
9. Pileus pale brown to whitish, with star-shaped granular to slightly squamulose covering on whitish background; spores 11.0-16.0 × (6.5-)7.5-10.5 µm, with rounded apex with hyaline cap over germ pore **5. M. excoriata**
9. Pileus whitish with coarse brown squames; spores 9.5-11.5 × 6.5-8.0 µm, with truncate apex, without hyaline cap . . . . . **8. M. venenata**
8. Annulus thickened, with double edge (crown), consisting of tissue of the velum universale on the underside, and of the velum partiale fringed on the upperside
10. Stipe context becoming pale brown on exposure; pileus covering with ascending hyphae with loosely arranged terminal, brown, cylindrical elements; cheilocystidia lageniform to narrowly clavate with apical excrescence, colourless; spores with translucent cap on germ pore; clamp-connections absent **Leucoagaricus nympharum**
10. Stipe context discolouring orange-red when cut; pileus covering (velum patches) trichodermal with closely packed, narrowly clavate, terminal elements; cheilocystidia clavate, narrowly clavate or spheropedunculate, often with brown intracellular pigment; spores without translucent cap on germ pore; clamp-connections present at the base of basidia
11. Pileus with contrasting velar squames (brown on white to cream often fibrillose background); spores on average 9.8-11.1 × 6.3-7.7 µm . . . . . **6. M. rachodes**
11. Pileus squames (velar patches) not contrasting in colour with background fibrils, equally brown or grey-brown in colour; spores on average 8.7-10.0 × 5.8-6.6 µm . . . . . **7. M. olivieri**

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه *Macrolepiota* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

بررسی مشخصات میکروسکوپی اسپورهای نمونه‌های جمع‌آوری شده این گونه نشان داد که اسپورها

به ابعاد:

8.5-11.6 (-14) x 6.2-8.6 (-9.1) µm, [10.1 ± 0.84 x 7.5 ± 0.58, Q = 1.14-1.55, Qm = 1.35 ± 0.1, n = 30]

بودند.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Macrolepiota* در این پژوهش

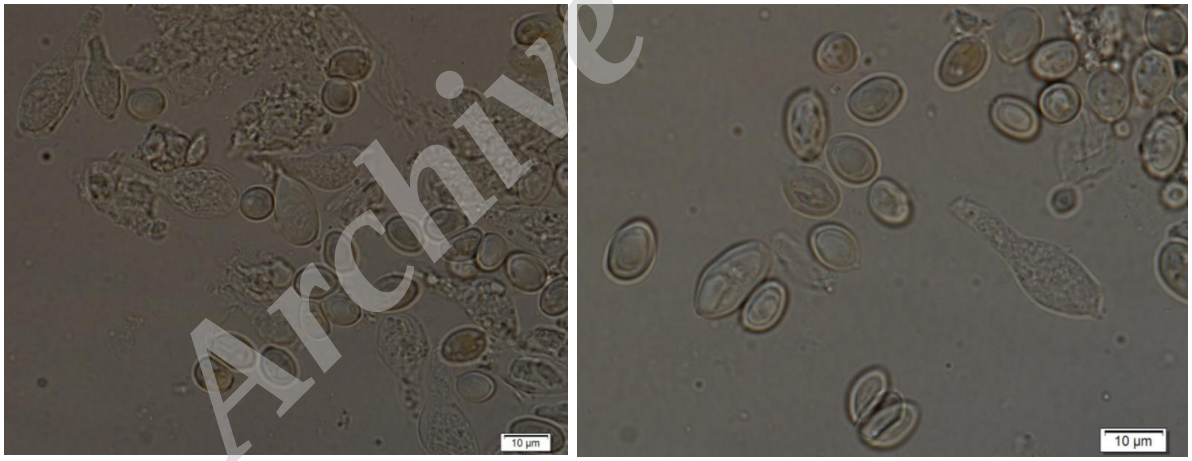
ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	101	*Macrolepiota*	*Macrolepiota konradii* isolate HAI-989	مازندران، جنگل حاشیه جاده کلاردشت به عباس آباد، N36 38 19.7 E51 06 35.7, 375 m

[1] **این** کد مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۴ ارائه شده و مربوط بـه نمونـه‌بـرداری نمونـه‌بـرداری از رامسـر، بهشهر، ساری، کلاردشت (۵ آبان ۹۵)

Archive of SID

www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Macrolepiota sp.*، نمونه ۱۰۱، نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Macrolepiota sp.* اسپورها و بازیدیوم‌های کد ۱۰۱. نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Daedaleopsis*

Daedaleopsis J. Schröt., in Cohn, Krypt.-Fl. Schlesien (Breslau) 3(1): 492 (1888)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycetes; Incertae sedis, Polyporales, Polyporaceae, Daedaleopsis

ب) گونه تیپ

Daedaleopsis confragosa (Bolton) J. Schröt., in Cohn (1888)

پ) کلید شناسایی گونه تیپ *Daedaleopsis* (Kuo, 2005)

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه *Daedaleopsis* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

اندام باردهی چوبی سم اسب مانند، عدم وجود پایه و وجود منافذ اسپوردهی از مشخصات این جنس است.

بررسی مشخصات میکروسکوپی اسپورهای نمونه مورد بررسی نابالغ بود و اسپور نداشت.

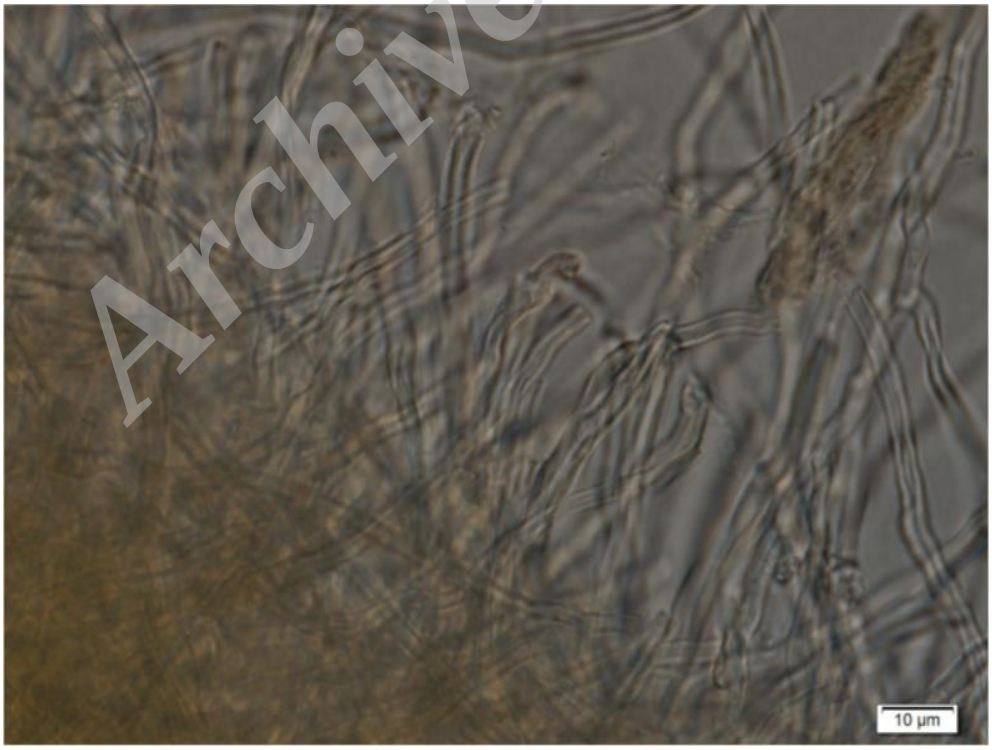
فهرست نمونه‌های نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Daedaleopsis* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	Royan 8	*Daedaleopsis*	*Daedaleopsis sp.*	مازندران، رویان

[1] این کدها مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۱ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های مازندران، رویان،شهریور ۱۳۹۴ است.

Archive of SID
www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی ***Daedaleopsis***. نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی *Daedaleopsis*. نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID
www.SID.ir

جنس *Ganoderma*

Ganoderma P. Karst., *Revue mycol.*, Toulouse 3(no. 9): 17 (1881)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetes incertae sedis; Polyporales; Polyporaceae; Ganoderma

ب) گونه تیپ

Ganoderma lucidum (Curtis) P.Karst. (1881)

پ) کلید شناسایی جنس

وجود بازیدیواسپورهای دارای دو دیواره از مشخصات تفکیک کننده جنس می باشد (Smith & Sivasithamparam 2000a). حدود و ثغور گونه های این جنس به خوبی مشخص نیست و تاکسونومی این جنس دارای مشکلات متعددی است(Moncalvo et al. 1995) .

این گونه برای اولین بار از چین گزارش شد (Patouillard (1907). *Ganoderma lucidum* sensu lato یک کمپلکس گونه ای است. صفات ریختشناسی مناسبی برای تفکیک این کمپکس گونه‌ای وجود ندارد. گونهای مشابه متعددی مانند *G. tsugae* Murrill از نقاط مختلف دنیا گزارش شده اند.

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Ganoderma* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

بررسی مشخصات میکروسکوپی اسپورهای نمونه‌های جمع آوری شده این گونه نشان داد که اسپورها به ابعاد: 7.8-9.6 x 4.7-6.7 µm, [8.7 ± 0.65 x 5.89 ± 0.65, Q = 1.27-1.73, Qm = 1.49 ± 0.18, n = 30]

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Ganoderma* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
نمونه برداری ۱	Nur 12	*Ganoderma applanatum*		نور
نمونه برداری ۲	Bozchaft2	*Ganoderma applanatum*	*Ganoderma sp.*	بابل N36 22.581 E52 46.596, 287m
نمونه برداری ۲	Neka23	*Ganoderma applanatum*		نکا N36 33.392 E53 22.512, 219m
نمونه برداری ۲	Neka25-1	*Ganoderma applanatum*	*Ganoderma sp.*	نکا N36 33.476 E53 22.681, 190m
نمونه برداری ۲	Neka28	*Ganoderma applanatum*		نکا N36 23.229 E53 23.162, 879m
نمونه برداری ۲	Neka29-1	*Ganoderma applanatum*	*Ganoderma applanatum*	نکا N36 23.249 E53 23.191, 874m
نمونه برداری ۳	GPS017	*Ganoderma applanatum*	*Ganoderma sp.*	جنگل نور N36 32.991 E52 04.727, 17 m
نمونه برداری ۴	۱۱۱	*Ganoderma applanatum*		جنگل کلاردشت به عباس آباد N36 38 24.2 E51 06 45.6, 415 m
نمونه برداری ۴	۱۴۸	*Ganoderma applanatum*		جنگل صفارود رامسر N36 52 34.4 E50 33 31.6, 656 m

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه برداری ۴	۱۵۰	*Ganoderma applanatum*		جنگل صفارود رامسر N36 52 34.1 E50 33 33.9, 658 m
نمونه برداری ۵	۱۹۳	*Ganoderma applanatum*		عباس آباد بهشهر N36 39 19.5 E53 35 59.5, 500 m
نمونه برداری ۵	۲۰۹	*Ganoderma applanatum*		عباس آباد بهشهر N36 39 20.5 E53 35 15.3, 387 m
نمونه برداری ۴	۱۳۹	*Ganoderma applanatum*		جنگل صفارود رامسر
نمونه برداری ۱	Nur 3	*Ganoderma lucidium*		نور
نمونه برداری ۱	Nur 4	*Ganoderma lucidium*		نور
نمونه برداری ۱	Nur 30	*Ganoderma lucidium*		نور
نمونه برداری ۵	۱۷۲	*Ganoderma lucidium*		زیراب به لاجیم ساری N36 14 18.8 E53 03 20.1, 862 m
نمونه برداری ۵	۱۸۶	*Ganoderma tsugae*	Ganoderma tsugae	عباس آباد بهشهر N36 39 14.4 E53 35 52.0, 519 m
نمونه برداری ۱	Nur 6	*Ganoderma lucidium*		نور

Archive of SID

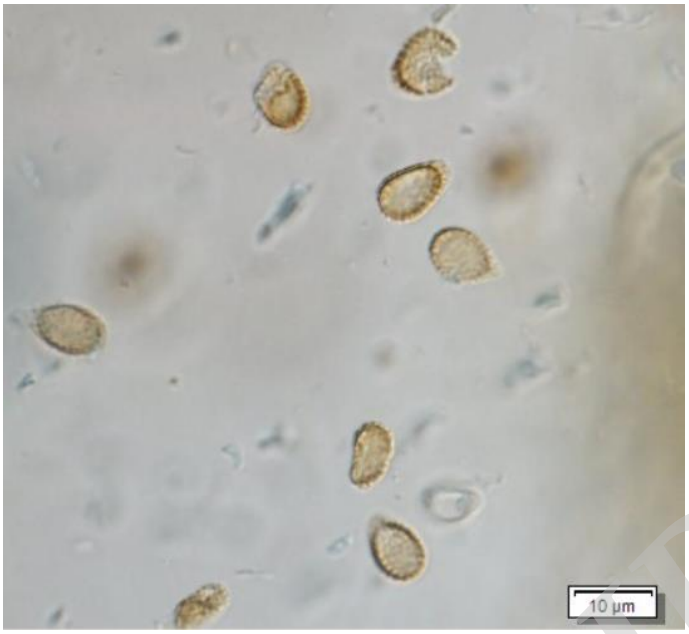
www.SID.ir

نمونه برداری ۳	GPS006	*Ganoderma lucidium*	جنگل نور N36 32.999 E52 04.776, 19 m
نمونه برداری ۴	۱۱۲	*Ganoderma lucidium*	جنگل کلاردشت به عباس آباد

[1] این کدها مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۱ ،جدول ۴-۲ ،جدول ۴-۳ و جدول ۴-۴ ارائه شده است.

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Ganoderma tsugae* (کد ۱۸۶)

Archive of SID
www.SID.ir



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Ganoderma tsugae* (کد ۱۸۶) نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Hypholoma*

Hypholoma (Fr.) P. Kumm., Der Führer in die Pilzkunde: 21, 72 (1871) [MB#17828]

Species Fungorum current name:

Psilocybe (Fr.) P. Kumm. 1871

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Strophariaceae

ب) گونه تیپ

Hypholoma fasciculare (Huds.) P. Kumm., Der Führer in die Pilzkunde: 72 (1871) [MB#152334]

پ) کلید شناسایی برخی گونه های جنس *Hypholoma* (Kuo, 2016)

1	Growing in woodchips; cap reddish or orangish to orangish brown, stem yellow; stem attached to an underground knot of tissue.	Hypholoma tuberosum
1	Not normally growing in woodchips; cap varying; stem color varying; stem not attached to an underground knot of tissue.	2
2	Growing scattered or gregariously (not usually in clusters) on the ground, or in mosses, or on peat or muck; cap under about 3 cm across (rarely slightly larger).	3
2	Growing in clusters or densely gregariously (rarely alone or scattered), on wood or near deadwood (but occasionally growing from dead roots and appearing terrestrial); cap variously sized.	11
3	Stem with a well-developed, tapering, underground, rooting portion.	Hypholoma radicosum
3	Stem without a well-developed rooting portion.	4
4	Most spores 11 µ long or longer.	5
4	Most spores shorter than 11 µ.	8

Archive of SID

www.SID.ir

5	Spores 14-18 µ long; cystidia developing irregular bumps and projections; probably southeastern in distribution.	Psilocybe longispora
5	Spores variously sized; cystidia not developing projections; distribution varying.	6
6	Fresh cap yellow; young gills yellowish; spores shorter than 14 µ.	Hypholoma elongatum
6	Fresh cap not yellow; gills not yellowish; spores variously sized.	7
7	Spores 13-18 µ long, with small germ pore.	Bogbodia udua
7	Spores 11-14 µ long, with large germ pore.	Hypholoma ericaeum
8	Most spores 7-9 µ long.	Hypholoma polytrichi
8	Most spores 9-11 µ long.	9
9	Mature gills dark purplish brown.	Psilocybe squalidella
9	Mature gills dull brown to yellowish brown.	10
10	Fresh cap with olive shades; spores narrowly ellipsoid.	Psilocybe olivaceotincta
10	Fresh cap yellow; spores broadly ellipsoid.	Hypholoma elongatum
11	Fresh cap red to brick red; appearing on the deadwood of hardwoods.	Hypholoma sublateritium
11	Fresh cap not red (or only slightly so over the center); usually associated with the deadwood of conifers (but rarely with the deadwood of hardwoods).	12
12	Gills greenish yellow when young, becoming smoky greenish with age; taste bitter.	Hypholoma fasciculare
12	Gills whitish, grayish, or dull yellowish when young, not developing greenish hues; taste usually not distinctive.	13
13	Usually growing in clusters; mature caps 3-7 cm across, yellowish brown to cinnamon overall, with a slightly darker area over the center.	Hypholoma capnoides

Archive of SID

www.SID.ir

13	Usually growing gregariously; mature caps 1-3 cm across, reddish brown with a thin, paler, marginal zone.	Hypholoma dispersum

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنس ***Hypholoma*** در این پژوهش: مشخصات ماکروسکوپی مشخص از جمله رشد خوشه ای روی کنده های پوسیده و داشتن رنگ تیغه های متمایل به سبز از مشخصات متمایز کننده این گونه است. اسپورهای نمونه های جمع آوری شده به ابعاد جدول زیر منطبق با نمونه تیپ این گونه بودند.

کد	اندازه اسپور
Hypholoma sp.	5.8-7.3 x 3.3-4.8 (-4.7) µm, [6.51± 0.35 x 3.94 ± 0.35, Q = 1.41-2.03, Qm = 1.66 ± 0.16, n = 30]
Hypholoma sp. (177)	5.6-6.9 (-6.6) x 3.7-4.9 (-4.5)µm, [6.11 ± 0.27 x 4.18 ± 0.23, Q = 1.29-1.76, Qm = 1.47 ± 0.10, n = 30]

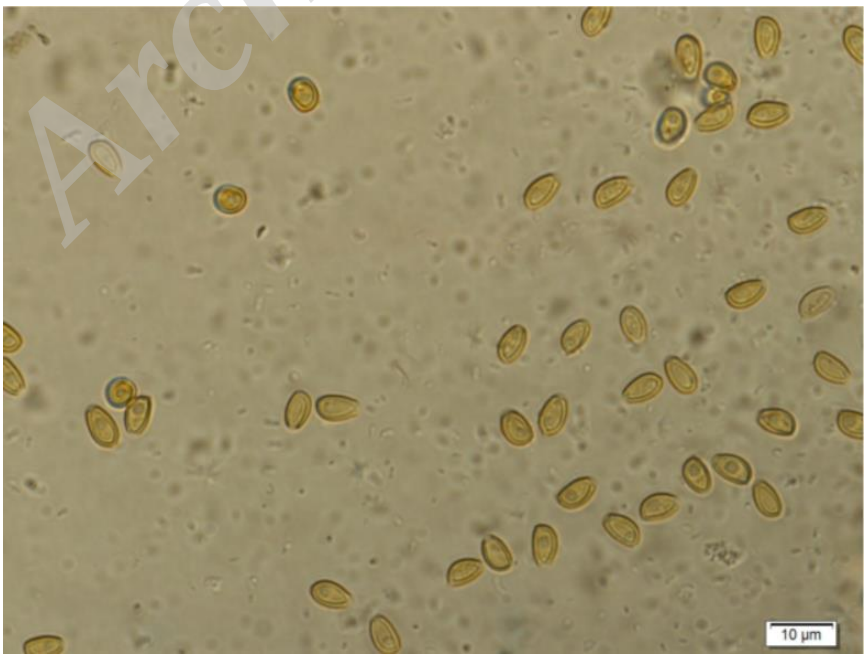
فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Hypholoma* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
نمونه برداری ۱	۱۰۶	*Hypholoma fasciculare*	*Hypholoma sp.*	N36 38 21.4 E51 06 44.3, 406 m
نمونه برداری ۲	۱۷۷	*Hypholoma fasciculare*	*Hypholoma sp.*	N36 14 15.4 E53 03 19.1, 853 m

[1] **این** کد مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۴ ارائه شده و مربوط بـه نمونـه‌بـرداری نمونـه‌بـرداری از رامسـر، بهشهر، ساری، کلاردشت (۵ آبان ۹۵)

Archive of SID
www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی گونه‌ی *Hypholoma fasciculare*: a) رشد خوشه ای نمونه *Hypholoma sp.*، b) *Hypholoma sp.*، c) برش طولی *Hypholoma sp.*، d) بقایای حلقه در نمونه ۱۰۷. نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی گونه‌ی *Hypholoma fasciculare*: نمونه *Hypholoma sp.* نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID
www.SID.ir

جنس *Volvariella*

Volvariella Speg., Anal. Mus. nac. Hist. nat. B. Aires 6 [=ser. 2, 3]: 119 (1898)

وجود پرده عمومی و یا بقایای آن (ولوا) در ته پایه و همچنین رنگ صورتی تیغه ها از مشخصه اصلی شناسایی این جنس است.

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Pluteaceae ; Volvariella Speg. 1898

ب) گونه تیپ

Volvariella argentina Speg. (1898)

پ) کلید شناسایی کلید شناسایی برخی گونه های جنس Volvariella (Kuo, 2005)

1. Growing on other mushrooms (species of <u>*Clitocybe*</u>).	*Volvariella surrecta*
1. Not growing on other mushrooms.	2
2. Growing directly from wood (stumps, logs, trees).	3
2. Growing terrestrially, or in compost or woodchips.	9
3. Mature cap less than 4 cm wide.	4
3. Mature cap 4 cm wide or wider.	5
4. Cap velvety, brownish black over the center with radial brownish black fibers elsewhere; margin not lined; stem light gray; recorded from Florida (by a more trustable source than the state's elections board).	*Volvariella lepiotospora*
4. Cap not velvety, gray to bluish gray with dark radial fibers; margin lined; stem white; recorded from North Carolina. (Imperfectly described species; type collection lost.)	*"Volvariella cinerea"*
5. Cap surface bald (not granular, silky, or hairy) and slimy; margin lined; recorded from New York.	*Volvariella peckii*

Archive of SID

www.SID.ir

5. Cap surface granular, silky, or hairy, dry; margin lined or not; variously distributed.	6
6. Margin lined; cap surface "granular"; recorded from the Caribbean.	*Volvariella jamaicensis*
6. Margin not lined; cap surface silky or hairy; variously distributed.	7
7. Cap white or nearly so; cystidia well over 100 µ long.	*Volvariella bombycina*
7. Cap more highly colored; cystidia variously sized.	8
8. Cap sooty to dark coffee-colored; cystidia to 80 µ long; recorded from Mexico, Cuba, and Puerto Rico.	*Volvariella bakeri*
8. Not as above. Various wood-loving *Volvariellas* with non-white caps may key out here. Whether or not these mushrooms represent undescribed species or mere color forms of *Volvariella bombycina* remains to be determined. Contributor Richard Nadonfound what I have labeled *Volvariella sp. 01* in Quebec; I have found brownish specimens that otherwise equaled *Volvariella bombycina* in Illinois.	*Volvariella spp.?*
9. Mature cap 5 cm wide or wider.	10
9. Mature cap less than 5 cm wide.	16
10. Cap white or nearly so, bald.	11
10. Cap not whitish, bald or with fibers or scales.	12
11. Stem with grooves; cap dry, pure white; margin never lined; spores 16-23 µ long; recorded from Florida.	*Volvariella canalipes*
11. Stem without grooves; cap sticky to slimy when fresh, white but sometimes grayish over the center; margin sometimes finely lined; spores 11-21 µ long; widely distributed.	*Volvariella speciosa* = V. gloiocephala

Archive of SID

www.SID.ir

12. Cap drab to grayish or brownish. 13

12. Cap dark brown. 15

13. Stem often with a "ring" (resulting from the collapsing of the volva); cap drab with brownish scales; spores 9-12 µ long; reported from Washington D.C. and possibly Michigan. (Imperfectly described species; type collection lost.) *"Volvariella avellanea"*

13. Not as above. 14

14. Cap 5-10 cm across; stem up to 2 cm wide; spores 7-10.5 µ long; "widely distributed" but typically reported from woodchips, greenhouses, botanical gardens, compost piles, and so on. *Volvariella volvacea*

14. Cap 2-6 cm across; stem up to 1 cm wide; spores 5.5-9 µ long; widely distributed east of the Rocky Mountains. *Volvariella taylori*

15. Cap smooth; odor not distinctive; spores 15-20 µ long; recorded from Alabama. *Volvariella alabamensis*

15. Cap finely hairy; odor strong and unpleasant; spores 6-8.5 µ long; recorded from Cuba. *Volvariella cubensis*

16. Stem often with a "ring" (resulting from the collapsing of the volva); cap drab with brownish scales; spores 9-12 µ long; reported from Washington D.C. and possibly Michigan. (Imperfectly described species; type collection lost.) *"Volvariella avellanea"*

16. Not as above. 17

17. Volva white and conspicuously hairy; cap grayish, 2.5-3.5 cm across, finely hairy; spores 6-7 µ long; found east of the Rocky Mountains. *Volvariella villosavolva*

17. Not completely as above. 18

18. Center area of cap white (the rest of the cap variously colored). 19

Archive of SID

www.SID.ir

18. Center of cap not white. 22

19. Cap completely smooth; spores 11-15.5 µ long; recorded from Cuba. *Volvariella earlei*

19. Cap with pressed-down fibers or finely hairy; spores 9 µ long or shorter; variously distributed. 20

20. Cap .5-1.5 cm across when mature; recorded from Michigan. *Volvariella pellucida*

20. Cap larger than above when mature; variously distributed. 21

21. Cap .5-3 cm across when mature; margin lined at maturity; stem smooth; found east of the Rocky Mountains. *Volvariella pusilla*

21. Cap 2-5 cm across when mature; margin not lined; stem densely but finely hairy; widely distributed in North America. *Volvariella hypopithys*

22. Cap grayish to pinkish gray or brownish gray, evenly colored (not markedly darker over the center portion); margin not lined; found east of the Rocky Mountains. *Volvariella taylori*

22. Cap whitish overall with a differently colored center, or grayish with a blackish center; margin lined or not; variously distributed. 23

23. Cap whitish overall with a pinkish center; margin not lined; recorded from the Pacific Northwest. *Volvariella smithii*

23. Not as above. 24

24. Cap whitish overall with a black center; margin not lined; spores 7-8.5 µ long; recorded from Florida. *Volvariella alachuana*

24. Cap grayish overall with a blackish center; margin or nearly the entire cap deeply grooved, reminiscent of small *Coprinus* species; spores 6-7 µ long; recorded from Michigan. *Volvariella nigrodisca*

Archive of SID

www.SID.ir

ت) مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی گونه *Volvariella* جمع‌آوری شده در این پژوهش:

گونه *Volvariella* نمونه موجود نابالغ و بدون اسپور بود.

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Volvariella* در این پژوهش

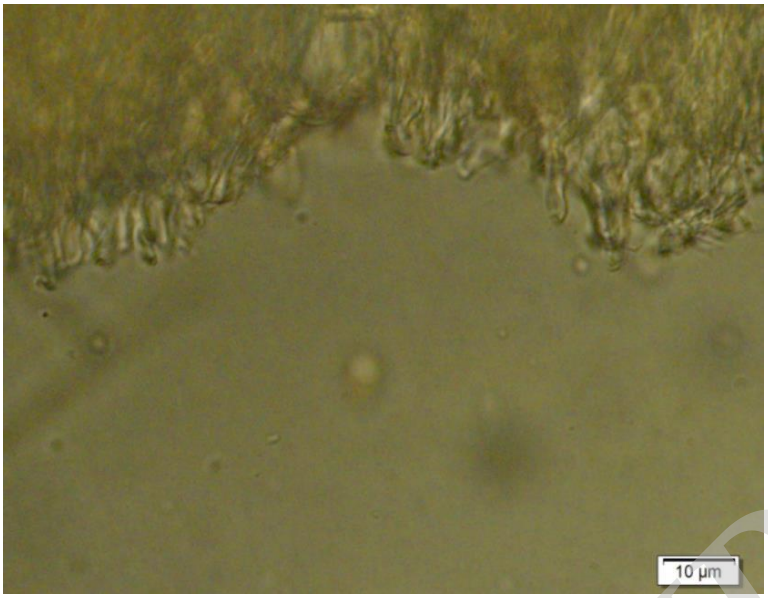
ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	Nur16	*Volvariella sp.*		N36 34.335 E51 47.770, 55 m

[1] این کد مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۱ ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از از جنگل‌های نور و رویان شهریور ۱۳۹۴.

ویژگی‌های ماکروسکوپی جنس *Volvariella*. نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.

Archive of SID

www.SID.ir



ویژگی‌های میکروسکوپی جنس *Volvariella*: . نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Fomes*

Fomes (Fr.) Fr., Summa veg. Scand., Sectio Post. (Stockholm): 319 (adnot.), 321 (1849)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; incertae sedis; Polyporales; Polyporaceae

ب) گونه تیپ

Fomes fomentarius (L.) Fr., Summa vegetabilium Scandinaviae 2: 237 (1849) [MB#194860]

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Fomes*

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	Darabkola21	*Fomes*	*Not Identified yet*	نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا
۲	131	*Fomes*	*Fomes fomentarius*	N36 50 42.1 E50 33 41.6, 1280 m

[1] این کدها مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۲ و جدول ۴-۴ ارائه شده است.

ویژگی‌های ماکروسکوپی جنس *Fomes* نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Lenzites*

Lenzites Fr., Corpus Florarum provincialium suecicae I. Floram Scanicam: 339 (1835) [[MB#17931

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; , incertae sedis; Polyporales; Polyporaceae

ب) گونه تیپ

Lenzites betulina (L.) Fr., Epicrisis Systematis Mycologici: 405 (1838) [MB#199017]

پ) کلید شناسایی جنس *Lenzites*

تشخیص جنس از سایر جنس های نزدیک به آسانی از طریق مشاهده منفذ هایی کشیده که حالت تیغه به خود گرفته اند انجام می شود.

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Lenzites* در این پژوهش

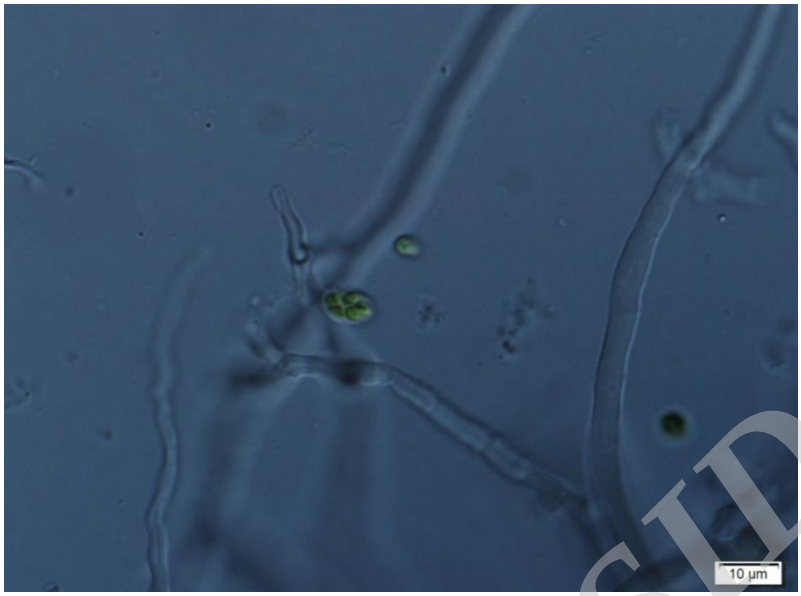
ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	170	نابالغ	–	۸۶۸ متر، N36 14 19.0 E53 03 20.5
۲	Darabkola5	*Lenzites*	–	–

[1] این کد مطابق با آن چیزی است که در جدول ۴-۲ و جدول ارائه شده و مربوط به نمونه‌برداری از بابل، ساری و نکا اردیبهشت ۱۳۹۵ و نمونه‌برداری از مازندران، ساری، زیراب به لاجیم آبان ۱۳۹۵

Archive of SID

www.SID.ir

ویژگی‌های ماکروسکوپی نمونه ۱۷۰ نشانگر اندازه: یک سانتی‌متر.



ویژگی‌های میکروسکوپی *Lenzites*. نشانگر اندازه: ده میکرومتر.

Archive of SID

www.SID.ir

جنس *Agaricus*

Agaricus L., Sp. pl. 2: 1171 (1753)

الف) جایگاه تاکسونومیکی

Fungi; Basidiomycota; Agaricomycotina; Agaricomycetes; Agaricomycetidae; Agaricales; Agaricaceae

ب) گونه تیپ

Agaricus campestris L. [as 'campester'], Sp. pl. 2: 1173 (1753)

فهرست نمونه‌های بدست آمده و مطالعه شده در جنس *Agaricus* در این پژوهش

ردیف	کد[1]	نتیجه شناسایی ریخت‌شناسی	نتیجه شناسایی مولکولی	موقعیت جغرافیایی نمونه
۱	A304	*Agaricus moelleri*	**انجام نشده**	**نور**
۲	A302	*Agaricus moelleri*	**انجام نشده**	**رودسر**
۳	A301	*Agaricus pseudolutosus*	**انجام نشده**	**رودسر**

[1] این کدمربوط به نمونه‌برداری از جنگل‌های نور و رودسر در ۱۳۹۶/۸/۱۷ و ۱۳۹۶/۷/۲۰ است.

Archive of SID
www.SID.ir

پیوست ۴: جدول مشخصات کشت مایع جدایه‌های قارچ‌های بومی (منطبق بر جدول ۴-۱۷)

کد	اسم علمی	%	وزن میسیلیوم خشک شده	وزن توده میسیلیومی	حجم محیط	تعداد روز	تاریخ خروج از شیکر	تاریخ کشت	وزن خشک (با کاغذ)	وزن تر (با کاغذ)	وزن کاغذ صافی
macrolepiota	*Macrolepiota konradii*	**12.18**	1.45	11.9	150 cc	**26**	8.8.96	12.7.96	3.7	14.15	2.25
ganoderma	*Ganoderma tsugae*	**4.78**	0.7	14.65	150 cc	**26**	8.8.96	12.7.96	2.9	16.85	2.2
Lycopedron	*Lycoperdon pyriforme*	**8.06**	0.75	9.3	150 cc	**26**	8.8.96	12.7.96	4.1	12.65	3.35
Donkia	*Donkia pulcherrima*	**7.94**	0.5	6.3	150 cc	**26**	8.8.96	12.7.96	1.65	7.45	1.15
Hohenbohelia	*Hohenbuehelia auriscalpium*	**14.29**	0.7	4.9	150 cc	**26**	8.8.96	12.7.96	2.25	6.45	1.55
Fomes	*Fomes fomentarius*	**10.11**	0.9	8.9	150 cc	**14**	26.7.96	12.7.96	2.65	10.65	1.75
Lenzites	*Lenzites tricolor*	**5.42**	0.75	13.85	150 cc	**14**	26.7.96	12.7.96	2.95	16.05	2.2
Pholiota	*Pholiota aurivella*	**4.52**	0.8	17.7	150 cc	**14**	26.7.96	12.7.96	2.75	19.65	1.95
Hypholoma	*Hypholoma fasciculare*	**4.63**	0.5	10.8	150 cc	**14**	26.7.96	12.7.96	2.4	12.7	1.9
130	*Trametes sp.*	**5.63**	0.2	3.55	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.1	4.45	0.9
Royan 8	*Daedaleopsis sp.*	**3.85**	0.1	2.6	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.25	3.75	1.15
Neka 25-2	*Trametes sp.*	**5.77**	0.15	2.6	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.25	3.7	1.1
179	*Trametes sp.*	**6.59**	0.3	4.55	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.5	5.75	1.2
Gps 30	*Marasmiellus sp.*	**4.94**	0.2	4.05	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.45	5.3	1.25
Darabkola 13	*Trametes sp.*	**3.77**	0.3	7.95	40 cc	**12**	13.8.96	1.8.96	1.3	8.95	1
Royan 1	*Leucoagaricus sp.*	**4.57**	0.08	1.75	40 cc	**20**	21.8.96	1.8.96	0.92	2.59	0.84
173	*Armillaria sp.*	**4.91**	0.19	3.87	40 cc	**20**	21.8.96	1.8.96	1.3	4.98	1.11

Archive of SID

www.SID.ir

0.92	5.4	1.21	1.8.96	21.8.96	**20**	40 cc	4.48	0.29	**6.47**	*Ganoderma sp.*	**Neka 25-1**
1.09	3.12	1.19	1.8.96	21.8.96	**20**	40 cc	2.03	0.1	**4.93**	*Cyclocybe sp.*	**Darabkola 20**
1.31	3.5	1.39	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	2.19	0.08	**3.65**	*Hypholoma sp.*	**GPS 177**
1.22	4.31	1.42	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	3.09	0.2	**6.47**	*Paraconiothyrium brasiliense*	**Royan 6**
1.38	4.42	1.54	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	3.04	0.16	**5.26**	*Xylariaceae sp.*	**Darabkola 8**
1.26	4.26	1.44	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	3	0.18	**6.00**	*Hydnopolyporus fimbriatus*	**GPS 029**
1.54	5.27	1.69	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	3.73	0.15	**4.02**	*Trametes gibbosa*	**Nur 8**
1.55	5.82	1.77	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	4.27	0.22	**5.15**	*Coprinellus disseminatus*	**Nur 9**
3.62	12.67	3.92	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	9.05	0.3	**3.31**	*Pestalotiopsis versicolor*	**Nur 2**
1.15	5.73	1.36	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	4.58	0.21	**4.59**	*Trametes versicolor*	**GPS 007**
1.26	5.82	1.48	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	4.56	0.22	**4.82**	*Psathyrella candolleana*	**NUR 10**
1.13	4.32	1.28	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	3.19	0.15	**4.70**	*Trametes gibbosa*	**GPS 022**
2.95	13.41	3.35	15.8.96	30.8.96	**15**	40 cc	10.46	0.4	**3.82**	*Pestalotiopsis versicolor*	**GPS 016**
1.69	20.18	2.3	27.9.96	19.10.96	**22**	40 cc	18.49	0.61	**3.30**	*Neopestalotiopsis sp.*	**Neka 29-1**
1.57	3.96	1.81	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	2.39	0.24	**10.04**	*Xylariaceae sp.*	**Gps 002**
1.61	15.55	2.03	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	13.94	0.42	**3.01**	*Irpex lacteus*	**Gps 005**
1.36	9.09	1.69	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	7.73	0.33	**4.27**	در دست شناسایی	**Gps 12**
1.42	12.8	2.02	27.9.96	19.10.96	**22**	40 cc	11.38	0.6	**5.27**	*Ganoderma sp.*	**Gps 017**
0.68	4.75	0.86	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	4.07	0.18	**4.42**	*Ganoderma sp.*	**Gps 037**
0.74	6.25	0.96	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	5.51	0.22	**3.99**	*Ganoderma sp.*	**Gps 038**
1.67	6.06	1.97	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	4.39	0.3	**6.83**	*Trametes hirsuta*	**Gps 042**
0.67	12.43	1.17	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	11.76	0.5	**4.25**	در دست شناسایی	**Gps 047**

Archive of SID

www.SID.ir

1.56	6.07	1.83	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	4.51	0.27	**5.99**	*Ganoderma sp.*	**Gps 052**
1.13	5.71	1.39	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	4.58	0.26	**5.68**	در دست شناسایی	**Gps 057**
0.63	5.74	0.88	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	5.11	0.25	**4.89**	*Trametes gibbosa*	**Gps 063**
0.7	2.93	0.83	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	2.23	0.13	**5.83**	*Stereum hirsutum*	**Darabkola 1**
0.69	3.15	0.84	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	2.46	0.15	**6.10**	در دست شناسایی	**Darabkola 11**
1.18	9	1.53	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	7.82	0.35	**4.48**	شناسایی مورفولوژیکی *fomes*	**Darabkola 21**
1.54	6.23	1.82	19.9.96	4.10.96	**14**	40 cc	4.69	0.28	**5.97**	*Ganoderma sp.*	**Bozchaft 2**
1.35	4.4	1.85	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	3.05	0.5	**16.39**	*Ganoderma lucidium* مورفولوژیکی	**172**
1.3	4.31	1.56	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	3.01	0.26	**8.64**	*Trametes sp.*	**119**
1.13	8.21	1.84	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	7.08	0.71	**10.03**	شناسایی مورفولوژیکی *pleurotus*	**184**
1.1	3.34	1.24	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	2.24	0.14	**6.25**	*Hypholoma sp.*	**106**
1.28	6.46	1.56	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	5.18	0.28	**5.41**	*Trametes versicolor*	**107**
1.45	5.15	1.72	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	3.7	0.27	**7.30**	*Trametes* مورفولوژیکی	**128**
1.56	8.38	1.91	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	6.82	0.35	**5.13**	*Trametes sp.*	**122**
1.26	4.22	1.5	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	2.96	0.24	**8.11**	*Irpex sp.*	**146**
1.34	8.93	1.68	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	7.59	0.34	**4.48**	*Trametes* مورفولوژیکی	**167**
1.43	5.91	1.65	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	4.48	0.22	**4.91**	*Pochonia chlamydosporia*	**197**
1.3	5.83	1.58	6.10.96	19.10.96	**13**	40 cc	4.53	0.28	**6.18**	در دست شناسایی	**208**

Archive of SID

www.SID.ir

پیوست ۵: ثبت سویه‌ها در بانک ژن و همچنین در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

در مرحله پایانی این تحقیق، سویه‌ها به منظور کنترل کیفیت رشد، تجدید پذیری، نگهداری طولانی مدت، طبقه‌بندی و درج در کاتالوگ آنلاین مرکز ملی ذخایر و همچنین ثبت توالی در NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۵۲ سویه تایید مولکولی شده مندرج در جدول ۴-۶ این گزارش، ۳ جدایه GPS 007، GPS 130 و GPS 176، به روشهای نگهداری بلند مدت پاسخ مناسب نداده و قابل تجدید کشت نبودند و لذا از بررسی‌های بعدی حذف شدند. به عنوان جایگزین، شناسایی ۷ جدایه دیگر (که در جدول ۴-۵ تحت عنوان در حال شناسایی ذکر شده بودند) شامل Darabkola 21، GPS 047، GPS 057، GPS 128، GPS 167، GPS 172 و GPS 208 انجام شد. در نتیجه، مجموعا ۵۶ سویه قارچ بومی استان مازندران به طور کامل در مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران نگهداری طولانی مدت و طبقه‌بندی شد و همچنین توالی آنها در NCBI ثبت گردید. کاتالوگ آنلاین این سویه‌ها با مراجعه به وب سایت مرکز ملی ذخایر (بخش میکروارگانیسم‌ها و زیر بخش کپک‌ها و مخمرها) یا از طریق لینک زیر قابل مشاهده است:

http://www.ibrc.ir/index.aspx?fkeyid=&siteid=1&fkeyid=&siteid=1&pageid=694&siteid=1

جداول صفحات بعدی، نام علمی ۵۶ سویه همراه با کد اولیه آنها (بر اساس مکان جمع آوری)، قطعه ژنی ITS یا LSU مورد استفاده برای تعیین گونه، کد دسترسی در بانک ژنی NCBI و کد دسترسی در بانک میکرارگانیسم‌های مرکز ملی ذخایر را نشان می‌دهد. همچنین برخی تصاویر آزمایشگاهی نگهداری این سویه‌ها در مرکز ملی ذخایر ارائه شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

طبقه‌بندی و ذخیره‌سازی ۵۶ سویه قارچ بومی استان مازندارن در مرکز ملی ذخایر

ردیف	شماره دسترسی IBRC	کد اولیه سویه‌ها	قطعه ژنی	شماره دسترسی GenBank	شناسایی
۱	IBRC-M 30422	Bozchaft 2	ITS	MK050589	*Ganoderma* sp.
۲	IBRC-M 30421	Darabkola 1	ITS	MK050606	*Stereum* sp.
۳	IBRC-M 30428	Darabkola 4	ITS	MK050610	*Trametes hirsuta*
۴	IBRC-M 30429	Darabkola 8	ITS	MK050620	*Nemania* sp.
۵	IBRC-M 30344	Darabkola 13	LSU	MK072624	*Trametes* sp.
۶	IBRC-M 30354	Darabkola 18	ITS	MK050586	*Exidia* sp.
۷	IBRC-M 30307	Darabkola-20	LSU	MK072616	*Cyclocybe* sp.
۸	IBRC-M 30427	Darabkola 21	ITS	MK050587	*Fomes fomentarius*
۹	IBRC-M 30425	Nur 2	ITS	MK050622	*Neopestalotiopsis* sp.
۱۰	IBRC-M 30409	Nur 8	ITS	MK050607	*Trametes gibbosa*
۱۱	IBRC-M 30430	Nur 9	ITS	MK050584	*Coprinellus* sp.
۱۲	IBRC-M 30431	Nur 10	ITS	MK050605	*Psathyrella* sp.
۱۳	IBRC-M 30310	Neka 24D	ITS	MK050585	*Donkia pulcherrima*
۱۴	IBRC-M 30306	Neka 25-1	LSU	MK072618	*Ganoderma* sp.

Archive of SID

www.SID.ir

ردیف	شماره دسترسی IBRC	کد اولیه سویه‌ها	قطعه ژنی	شماره دسترسی GenBank	شناسایی
۱۵	IBRC-M 30336	Neka 25-2	LSU	MK072623	*Trametes* sp.
۱۶	IBRC-M 30432	Neka 29-1	ITS	MK050621	*Neopestalotiopsis* sp.
۱۷	IBRC-M 30287	Royan 1	LSU	MK072620	*Leucoagaricus leucothites*
۱۸	IBRC-M 30364	Royan 3	LSU	MK072621	*Leucoagaricus* sp.
۱۹	IBRC-M 30341	Royan 4	LSU	MK072619	*Irpex lacteus*
۲۰	IBRC-M 30433	Royan 6	ITS	MK050619	*Didymosphaeria* sp. (*Paraconiothyrium brasiliense*)
۲۱	IBRC-M 30282	Royan 8	LSU	MK072617	*Daedaleopsis confragosa*
۲۲	IBRC-M 30446	GPS 002	ITS	MK050626	*Xylariaceae* sp.
۲۳	IBRC-M 30434	GPS 005	ITS	MK050600	*Irpex* sp.
۲۴	IBRC-M 30435	GPS 016	ITS	MK050623	*Neopestalotiopsis* sp.
۲۵	IBRC-M 30436	GPS 017	ITS	MK050590	*Ganoderma* sp.
۲۶	IBRC-M 30424	GPS 022	ITS	MK050608	*Trametes gibbosa*
۲۷	IBRC-M 30437	GPS 029	ITS	MK050583	*Ceriporia* sp.
۲۸	IBRC-M 30308	GPS-30	LSU	MK072622	*Marasmiellus* sp.

Archive of SID

www.SID.ir

Ganoderma sp.	MK050591	ITS	GPS 037	IBRC-M 30403	۲۹
Ganoderma sp.	MK050592	ITS	GPS 038	IBRC-M 30405	۳۰
Trametes hirsuta	MK050611	ITS	GPS 042	IBRC-M 30438	۳۱
Ganoderma adspersum	MK050593	ITS	GPS 047	IBRC-M 30439	۳۲
Ganoderma sp.	MK050594	ITS	GPS 052	IBRC-M 30407	۳۳
Trichaptum sp.	MK050617	ITS	GPS 057	IBRC-M 30440	۳۴
Trametes gibbosa	MK050609	ITS	GPS 063	IBRC-M 30441	۳۵
Macrolepiota sp.	MK050602	ITS	GPS 101	IBRC-M 30327	۳۶
Hypholoma fasciculare	MK050597	ITS	GPS 106	IBRC-M 30442	۳۷
Trametes sp.	MK050614	ITS	GPS 107	IBRC-M 30404	۳۸
Trametes sp.	MK050612	ITS	GPS 119	IBRC-M 30408	۳۹
Trametes sp.	MK050615	ITS	GPS 122	IBRC-M 30443	۴۰
Trametes versicolor	MK050613	ITS	GPS 128	IBRC-M 30444	۴۱
Fomes sp.	MK050588	ITS	GPS 131	IBRC-M 30313	۴۲
Pholiota sp.	MK050603	ITS	GPS 142	IBRC-M 30316	۴۳

Archive of SID

www.SID.ir

Irpex lacteus	MK050599	ITS	GPS 146	IBRC-M 30411	۴۴
Lycoperdon pyriforme	MK050601	ITS	GPS 158	IBRC-M 30318	۴۵
Bjerkandera adusta	MK050947	ITS	GPS 167	IBRC-M 30423	۴۶
Ganoderma sp.	MK050948	ITS	GPS 172	IBRC-M 30426	۴۷
Armillaria sp.	MK050582	ITS	GPS 173	IBRC-M 30400	۴۸
Hypholoma sp.	MK050598	ITS	GPS 177	IBRC-M 30355	۴۹
Trametes sp.	MK050616	ITS	GPS 179	IBRC-M 30399	۵۰
Polyporellus sp.	MK050604	ITS	GPS 180	IBRC-M 30324	۵۱
Ganoderma sp.	MK050595	ITS	GPS 186	IBRC-M 30334	۵۲
Didymosphaeria sp. (*Paraconiothyrium brasiliense*)	MK050618	ITS	GPS 188	IBRC-M 30311	۵۳
Hohenbuehelia sp.	MK050596	ITS	GPS 196	IBRC-M 30342	۵۴
Pochonia sp.	MK050625	ITS	GPS 197	IBRC-M 30416	۵۵
Pleosporales sp.	MK050624	ITS	GPS 208	IBRC-M 30445	۵۶

Archive of SID

www.SID.ir

کشت میسلیوم قارچ در لوله آزمایشگاهی برای نگهداری کوتاه مدت

نگهداری سویه‌ها در کرایوویال همراه با محافظ سرمایی در فریزر منهای ۷۰ برای نگهداری طولانی مدت و انجام سفارش توسط مشتری (۴ ویال به ازای هر سویه)

Archive of SID
www.SID.ir

نگهداری سویه‌ها در تانک ازت برای نگهداری طولانی مدت (۴ ویال به ازای هر سویه)

کنترل کیفی میسلیوم سویه‌ها از حیث آلودگی و شمارش سلولی قبل از درج در کاتالوگ و ذخیره سازی دائم

Archive of SID
www.SID.ir

Abstract

Considering the importance of native populations of higher fungi in biomedical research, breeding programs, biodiversity studies and genetic studies, it is essentially required to establish centers in the country to preserve native fungal samples alive under standard conditions to maintain their original properties. Therefore, this study was conducted with the aim of collecting living samples of higher fungi from Mazandaran province (which is known to be rich in valuable native higher fungal reserves) with an emphasis on important medical mushrooms. Sampling was performed in different regions of Mazandaran, each region twice, during four different periods in different seasons in 2015-2017. Data related to each isolate were recorded, including initial identification, geographical characteristics, color and odor variations, ring type, data on growth type (single or group) and habitat (soil and plants), color change of the fungus tissue by scratch or cut, ring structure, odor or aroma and reaction of Schaeffer's test. In addition, several digital pictures were taken from different parts of each sample at natural habitate. Then, primary tissue cultures of reproductive organs were performed on at least two culture media at sampling site, with the purpose of producing live mycelium in the shortest possible time before transferring to a more equipped laboratory. Besides, samples were dried and spore prints were prepared in order to be used for further identification on the basis of morphology (based on microscopic and macroscopic observations). A total of 198 wild mushroom isolates were collected from different genera, of which 91 isolates successfully produced live mycelium in culture medium, while other isolates were lost. Based on the morphological data, 62 successful isolates in tissue culture were subjected to ITS sequence analysis, resulting in identification of 52 isolates (strains) to genus or species level. Of these 52 isolates, 9 isolates were ascomycete and 43 isolates were basidiomycete. Concurrently with ITS analysis, all the 57 isolates were also studied for growth charavtersitics related to domestication. Domestication stages included purification in solid culture medium (using 4 culture media of PDA, CEA, MGA, YPG), spawn production in wheat or sawdust, production of submerged mycelium culture (in the culture medium of MGA for the production of mycelial biomass), and the possibility of fruiting body formation in a lignocellulosic substrate (based on wood chips). Indices such as mycelium type (strand, cottony, fluffy or without aerial mycelium), radial growth rate, density, color and geometric shape of the mycelium were studied and the data were statistically compared. The results showed that there were significant differences between the isolates and between the culture media in terms of the above-mentioned growth characteristics. Among the culture

Archive of SID

www.SID.ir

media, PDA and MGA demonstrated the best conditions for the growth of mycelium of native mushroom isolates ($p < 0.05$). All the 62 isolates morphologically confirmed in this study are kept as pure and reproducible mycelial culture so that they can be used in subsequent studies if necessary. The fruiting test also showed that isolates belonging to seven different basidiomycete genera were able to produce mushrooms in the lignocellulosic substrate, including: *Donkia pulcherrima, Lenzites tricolor, Ganoderma tsugea, Cyclocybe* sp., *Pholiota aurivella, Trametes* sp., and *Daedaleopsis tricolor*. Previous studies have showed that these mushroom species had antimicrobial and anti-cancer properties, showing significance in biomedical research. Therefore, success in domestication of these wild mushroom species in artificial substrates may facilitate further research on their biological activities.

Keywords:

Mazandaran, indiginous mushrooms, collection and identification, ITS, domestication, mycelial pure culture, wild mushroom biobank

Archive of SID

www.SID.ir

ACECR-Khorasan Razavi Province Branch

Iranian Biological Resource Center (IBRC)

Final report:

Collection, identification and classification of wild populations of higher fungi indigenous to Mazandaran province

Code: 2283-11

Research group:

Idustrial fungi biotechnology research group of ACECR-Khorasan Razavi Province Branch

Microorganism Bank of IBRC

Principal Investigators (BY):

Hamid Reza Pourianfar (PhD, Plant Biotechnology)

Mohammad Ali Amoozegar (PhD, Microbiology)

June, 2018

Archive of SID

www.SID.ir